

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen
Verfahrens zum Nachweis von T2-Toxin

Selcuk Esgin

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen
Verfahrens zum Nachweis von T2-Toxin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Selcuk E s g i n

aus

Karabük/T ü r k e i

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Buschmann

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Herstellung: Copyland Amalienstr.46 8 München 40

Inhaltsverzeichnis		
1.	Einleitung	1
2.	1.1.1. Allgemeines	2
3.	1.1.2. Zielsetzung	3
4.	1.1.3. Aufgabenstellung	4
5.	1.1.4. Organisation	5
6.	1.1.5. Zeitplan	6
7.	1.1.6. Wirtschaftliche Grundlagen	7
8.	1.1.7. Technische Grundlagen	8
9.	1.1.8. Rechtliche Grundlagen	9
10.	1.1.9. Zusammenfassung	10
11.	2. Meine Tochter	11
12.	2.1.1. Allgemeines	12
13.	2.1.2. Zielsetzung	13
14.	2.1.3. Aufgabenstellung	14
15.	2.1.4. Organisation	15
16.	2.1.5. Zeitplan	16
17.	2.1.6. Wirtschaftliche Grundlagen	17
18.	2.1.7. Technische Grundlagen	18
19.	2.1.8. Rechtliche Grundlagen	19
20.	2.1.9. Zusammenfassung	20
21.	3. Zusammenfassung	21
22.	3.1.1. Allgemeines	22
23.	3.1.2. Zielsetzung	23
24.	3.1.3. Aufgabenstellung	24
25.	3.1.4. Organisation	25
26.	3.1.5. Zeitplan	26
27.	3.1.6. Wirtschaftliche Grundlagen	27
28.	3.1.7. Technische Grundlagen	28
29.	3.1.8. Rechtliche Grundlagen	29
30.	3.1.9. Zusammenfassung	30
31.	4. Zusammenfassung	31
32.	4.1.1. Allgemeines	32
33.	4.1.2. Zielsetzung	33
34.	4.1.3. Aufgabenstellung	34
35.	4.1.4. Organisation	35
36.	4.1.5. Zeitplan	36
37.	4.1.6. Wirtschaftliche Grundlagen	37
38.	4.1.7. Technische Grundlagen	38
39.	4.1.8. Rechtliche Grundlagen	39
40.	4.1.9. Zusammenfassung	40
41.	5. Zusammenfassung	41
42.	5.1.1. Allgemeines	42
43.	5.1.2. Zielsetzung	43
44.	5.1.3. Aufgabenstellung	44
45.	5.1.4. Organisation	45
46.	5.1.5. Zeitplan	46
47.	5.1.6. Wirtschaftliche Grundlagen	47
48.	5.1.7. Technische Grundlagen	48
49.	5.1.8. Rechtliche Grundlagen	49
50.	5.1.9. Zusammenfassung	50

INHALTVERZEICHNIS

	Seite
1	Einleitung
2	Schrifttum
2.1	Allgemeines über Trichothecene
2.2	T2- Toxin
2.2.1	Vorkommen
2.2.2	Eigenschaften
2.2.3	Metabolismus
2.3	Verfahren zum Nachweis von T2-Toxin
2.3.1	Physikalisch-Chemische Methoden
2.3.2	Immunologische Nachweise
2.3.2.1	Radioimmunoassay
2.3.2.2	Enzymimmunoassay
3	Eigene Untersuchungen
3.1	Immunisierungsversuche
3.1.1	Material
3.1.2	Methodik
3.1.2.1	Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Reinheit des T2-Toxins
3.1.2.2	Antigenherstellung
3.1.2.3	Immunisierung der Kaninchen
3.1.2.4	Aufarbeitung der Seren
3.2	Erstellung von Enzymimmunoassays gegen T2-Toxin
3.2.1	Material
3.2.2	Methodik
3.2.2.1	Markierung von T2-Toxin mit HRP mittels Carbodiimidmethode
3.2.2.2	Markierung von T2-Toxin mit HRP mittels gemischtem Anhydridverfahren
3.2.2.3	Markierung von HT2-Toxin mit HRP durch aktive Esterbildung
3.2.2.4	Nachweis der Antikörper mit den Enzymkonjugaten
3.2.2.5	Nachweis von T2-Toxin im homologen Test

3.2.2.6	Nachweis von T2-Toxin im heterologen Test	36
3.2.2.7	Ergebnisse	38
3.2.3	Standardisierung des ELISA für T2-Toxin	41
3.2.3.1	Abstimmung der Reaktionspartner	41
3.2.3.2	Prüfung auf Kreuzreaktionen mit anderen Trichothecenen	42
3.2.3.3	Ergebnisse	42
3.3	Nachweis von T2-Toxin in Futtermitteln mittels ELISA	42
3.3.1	Material	42
3.3.2	Methodik	45
3.3.3	Ergebnisse	45
3.4	Nachweis von T2- und HT2-Toxin in Milch und anderen Körperflüssigkeiten	49
3.4.1	Nachweis von HT2-Toxin mittels ELISA	49
3.4.2	Vorversuche	49
3.4.2.1	Material	49
3.4.2.2	Methodik	49
3.4.2.3	Ergebnisse	56
3.5	Untersuchungen von Körperflüssigkeiten nach Verfütterung von T2-Toxin	56
3.5.1	Kurzzeitfütterungsversuche	56
3.5.2	Langzeitfütterungsversuch	56
3.5.3	Ergebnisse	57
4	Diskussion	60
5	Zusammenfassung	67
6	Summary	68
7	Literatur	70

1 EINLEITUNG

Die Trichothecene stellen eine Gruppe biologisch aktiver Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen dar, unter denen T2-Toxin eines der giftigsten ist, dem aufgrund seiner biologischen Aktivitäten wie Immunsuppressivität, Hauttoxizität und Zytotoxizität eine besondere Bedeutung zukommt.

T2-Toxin kann von Fusarien-Arten in verschiedenen Medien und Temperaturen in Gramm-Quantitäten produziert werden (BURMEISTER, 1971; UENO et al., 1975; CULLEN et al., 1982; RABIE et al., 1986;) und stellt somit eine besondere Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar.

Zum Nachweis von T2-Toxin werden zum einen empfindliche aber unspezifische biologische Methoden, zum anderen spezifische physikalisch-chemische Verfahren verwendet, die jedoch eine Konzentrierung des Probenmaterials und langwierige Aufbereitungsschritte erfordern.

Die in den letzten Jahren entwickelten enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen, darunter auch gegen T2-Toxin, scheinen dagegen eher für Routineuntersuchungen geeignet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein solches Testsystem für T2-Toxin zu erstellen, mit dem weiteren Ziel Futter- und Lebensmittel, speziell Milch, aber auch andere Körperflüssigkeiten auf dieses Mykotoxin untersuchen zu können.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeines über Trichothecene

Trichothecene sind Sesquiterpenoide, die alle die gleiche Grundstruktur, nämlich ein Ringsystem mit einer Doppelbindung bei C-9,10 und einen Epoxidring bei C-12,13 aufweisen (BAMBURG und STRONG, 1971; TAMM, 1977; UENO, 1977; UENO, 1983). Es handelt sich um sehr stabile Verbindungen, die bei 125°C nach 30 min noch nicht zerstört sind; bei 110°C sind sie sogar länger als 18 h stabil. Verschimmelter Korn behielt sechs Jahre seine Toxizität (MOREAU, 1979). Trichothecene bestehen aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff und sind niedermolekulare Verbindungen, die bei der Suche nach Antibiotika entdeckt worden waren (BRIAN und MCGOWAN, 1946). Erst später wurden sie nach dem Trichothecin benannt, das von *Fusarium roseum* erstmals isoliert wurde (FREEMAN und MORRISON, 1948).

Trichothecene werden von einer Reihe von Schimmelpilzen, hauptsächlich von Fusarien-, aber auch von *Myrothecium*-, *Trichoderma*-, *Cephalosporium*-, *Verticimonosporium*- und *Stachybotrys*-arten gebildet (BAMBURG und STRONG, 1971; UENO, 1977; UENO, 1983). Jede Spezies vermag mehr als ein Toxin zu produzieren. Zum Beispiel produziert *Fusarium tricinctum* T2-Toxin, HT2-Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS). *Stachybotrys atra* bildet mehrere Arten von makrocyclischen Trichothecen (UENO, 1977).

Fusarien-Arten sind sehr resistent gegenüber Kälte und wachsen langsam bei -10°C. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 24°C. Eine Periode von vier Monaten bei -20°C können sie überstehen, werden aber bei 100°C in zehn Minuten zerstört (MOREAU, 1979). Die Fusarien-Arten vermögen bei relativ niedrigen Temperaturen zum Teil schon während der Wachstums- und Reifungsphase, Toxin zu produzieren (BAMBURG et al., 1969; MOREAU, 1979; BAUER, 1982)

Trichothecene sind neurotoxisch, zytotoxisch, phytotoxisch, hauttoxisch und wirken immunsuppressiv (UENO et al., 1968; WEI et al., 1972; WYATT et al., 1973; EPPLEY, 1975; Mc LAUGHLIN et al., 1977; SATO und UENO, 1977). Diese toxischen Eigenschaften können für den semiquantitativen Nachweis der Trichothecene dienen. Diese Wirkungen beruhen zum Teil auf der Störung der Proteinsynthese, die von den einzelnen Toxinen unterschiedlich beeinflusst wird. Eine 50%ige Hemmung der Proteinsynthese erfordert 100-fach größere Mengen an Nivalenol als an T2-Toxin (0,03 µg/ml), während für die akute Toxizität bei Mäusen (i.p.) die gleiche LD₅₀ ermittelt wurde (für T2-Toxin 5,2 mg, Nivalenol 4,1 mg pro kg KGW bei sechs Wochen alten Mäusen; UENO et al., 1973). Neugeborene Tiere sind gegenüber Trichothecenen sehr empfindlich. Bei neugeborenen Mäusen wurde von UENO (1983) für Fusarenon X eine LD₅₀ von 0,23 mg/kg KGW ermittelt, während sich für adulte Tiere eine LD₅₀ von 4,2 mg/kg KGW ergab.

Die immunsuppressive Wirkung der Trichothecene wurde zuerst von UENO et al. (1968) beschrieben. Nivalenol hemmt die Proteinsynthese bei Kaninchen-Retikulocyten. McLAUGHLIN et al. (1977) berichten, daß zwölf Trichothecene die Proteinsynthese hemmen, wobei T2-Toxin, DAS und Verrucaridin A in der Einleitungsphase, die anderen erst in der Verlängerungs- und Endphase eingreifen.

PATHRE und MIROCHA (1977) teilen die Trichothecene nach deren Polarität und Löslichkeit in zwei Gruppen (Tab.1):



Tabelle 1: Die Gruppierung der Trichothecene

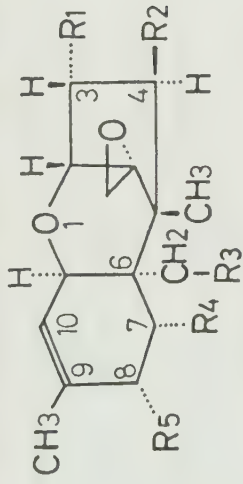
	Trichothecene	Lösungsmittel
Gruppe A:	T2-Toxin, HT2-Toxin Diacetoxyscirpenol (DAS) Neosolaniol, Verrucarol, Monoacetoxyscirpenol, Verrucarine und Roridine	Ethylacetat, Aceton, Chloroform Methylenchlorid und Diethylether
Gruppe B	Scirpentriol, T2-Tetraol, Deoxynivalenol und Nivalenol	Methanol Ethanol

Eine solche Gruppierung ist vor allem für die physikalisch-chemischen Nachweismethoden der Trichothecene von Nutzen. Mehr als 45 verschiedene Trichothecene wurden bis heute charakterisiert. Sie werden von UENO (1977, 1983) in vier Gruppen geteilt, von denen die wichtigsten in Tab.2 aufgeführt sind.

Eine Übersicht über die durch Trichothecene verursachten Toxikosen gibt nach UENO (1977) Tab.3 . WORONIN berichtete bereits 1891 von Taumelgetreide-Toxikose, bei welcher der Verzehr von Brot, das mit verschimmeltem Getreide gebacken worden war, Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit und Erbrechen hervorrief.

UENO et al. (1972a, 1972b), JOFFE (1974) und UENO (1977) machten *F.sporotrichoides* und *F.poa* für die sogenannte Alimentary Toxic Aleukia (ATA) verantwortlich, die während

Tabelle 2: Die Gruppierung der Trichothecene nach UENO (1977).



Toxine	Eigenschaften	Toxinbildner
Gruppe A: T2-Toxin, HT2-Toxin, Neosolaniol, Diacetoxyscirpenol, Monoacetoxyscirpenol, Scirpenteriol, Triacetoxyscirpenol, Trichodermol, Trichodermin, Acetyl-T2-Toxin.	R ₁ - R ₅ (H, Hydroxylgruppe, Acetylgruppe, Isovalerylgruppe)	Fusarium tricinctum " poae " roseum " sporotrichoides
Gruppe B: Nivalenol, Diacetylivalenol, Deoxynivalenol (DON), 3-Acetyl-DON, Fusarenon-X,	Eine Ketogruppe bei C-7,8	Fusarium graminearum " nivale " episphaeria " oxysporum
Gruppe C: Crotocin	Eine 2. Epoxidgruppe bei C-8	Cephalosporium crotocinigenum Trichothecium roseum
Gruppe D: Roridin A, D, E, H, Verrucarin A,B,J., Satratoxin.	Makrocyclisch (ein zusätzlicher Ring, der zwischen C-4 und C-15 gespannt ist)	Stachybotrys atra Myrothecium verrucaria

Tabelle 3: Durch Trichothecene verursachte Toxikosen nach Ueno (1977)

Toxikose	Länder und Tierarten	Symptome	Toxinbildner
Taumelgetreide-Toxicosis	Sibirien Mensch, Pferd, Schwein, Geflügel	Kopfschmerzen, Übelkeit Schüttelfrost, Erbrechen	G. saubinetti
Alimentary Toxic Aleukia	UdSSR Mensch, Pferd, Schwein	Erbrechen, Durchfall, Angina, Hautentzündungen, Leukopenie	F. sporotrichoides
Stachybotryosis	Europa Pferd	Schock, Hautnekrosen, Leukopenie	Stachybotrys atra
Bean-hull Toxicosis	Japan Pferd	Krämpfe, Drehkrankheit	F. solani et al.
Dendrodochio-toxicosis	Europa Pferd	Hautentzündung	Dendrochium toxicum
Moldy-Corn Toxicosis	USA Schwein, Rind	Erbrechen, Blutungen Futterverweigerung	F. tricinatum
Red-Mold Toxicosis	Japan Mensch, Pferd, Schwein Rind	Erbrechen, Durchfall, Abort	F. graminearum

des zweiten Weltkrieges in Orenburg/Rußland zu mehr als 10% Verlusten bei der Bevölkerung führte. Die Symptome von ATA sind nach UENO (1977) folgende:

- Futtermittelverweigerung,
- Erbrechen,
- Diarrhoe,
- Tachykardie,
- Hämorrhagien,
- Ödeme,
- Hautnekrosen,
- Blutungen im Epithel der Schleimhäute von Magen und Dünndarm,
- nervöse Störungen,
- Schädigung des hämatopoetischen Systems,
- Abnahme von Leucocyten und Trombocyten im Blut und Hämorrhagien der Meningen.

2.2 T2-Toxin

2.2.1 Vorkommen

Auf die Bedeutung von T2-Toxin in Futtermitteln wurde von einer Gruppe von Wissenschaftlern aus Wisconsin/USA hingewiesen, als die Anwesenheit dieses Mykotoxins in den USA zu Erkrankung und Tod von laktierenden Rindern führte (Moldy Corn Toxicosis). Das Toxin wurde hier von *Fusarium tricinctum* produziert (BAMBURG et al., 1968; HSU et al., 1972).

1973 wurde in einer Poae-fusarin-Probe, einem Mykotoxin das mit der Alimentary Toxic Aleukia (ATA) in Rußland in Verbindung gebracht wurde, nachgewiesen, daß die Probe bis zu 2,5 Prozent T2-Toxin enthielt (MIROCHA und PATHRE, 1973).

SZATHMARY et al. (1976) untersuchten aus Ungarn und der Sowjetunion stammende Rohextrakte, die aus mit *F. poae* und *F. sporotrichoides* verschimmelten Futtermitteln gewonnen worden waren und fanden T2-Toxin.

1985 wurde von GAREIS et al. auf Trichothecene in heimischen Futtermitteln hingewiesen. Danach kam dem Hafer eine besondere Bedeutung zu, da von 19 untersuchten Haferproben 14 im Hauttest positiv waren und in fünf Proben einwandfrei T2-Toxin identifiziert werden konnte. Bei mit Fusarien befallenen Getreide reichen die T2-Toxin-Konzentrationen von 76 ppb bis zu 4 ppm (MIROCHA et al., 1976; MIROCHA et al., 1979; PATHRE und MIROCHA, 1979; BARNIKOL et al., 1982).

2.2.2 Eigenschaften

Erstmals isoliert und charakterisiert wurde T2-Toxin aus einem Stamm von *F. tricinctum*, der auf Gregorys Medium bei 8°C gezüchtet wurde (BAMBURG et al., 1968). Eine Analyse des Toxins ergab die Summen-Formel $C_{24}H_{34}O_9$. Tab.4 enthält eine Übersicht über die Toxizität von T2-Toxin bei verschiedenen Tierarten.

Tabelle 4: Die LD_{50} von T2-Toxin (mg/kg KGW) bei verschiedenen Tierarten

Tierarten	Applikationsart			
	i.v.	i.p.	s.c.	p.o.
Maus (adult)		5,2		
Maus (neugeboren)			0,15	10,5
Ratte				5,2
Meerschweinchen				3,6
Katze			0,15	
Schwein	1,21			
Rind				3,8
Küken (ein Tag alt)				1,75
Küken (sieben Tage alt)				4,0
Truthahn				6,1

Bei Katzen, denen T2-Toxin in Dosen von 0,06 bis 0,1 mg/kg KGW per oral verabreicht worden war, wurden Erbrechen, blutige Diarrhoe, Ataxie, Leukopenie, Paralyse und Todesfälle beobachtet (LUTSKY et al., 1978). Weniger als 5 µg/g Futter T2-Toxin verursachten bei Ratten Futterverweigerung (KOTSONIS et al., 1975a), und bei Küken wurden nach T2-Toxin-Aufnahme neurotoxische Symptome festgestellt (WYATT et al., 1973). ROSENSTEIN et al. (1979) beobachteten die Abnahme der Antikörperproduktion bei Mäusen, denen roher F.poa-Extrakt i.p.injiziert worden war. Ein deutlicher Gewichtsverlust des Thymus wurde beschrieben. Der Extrakt enthielt T2-Toxin und DAS. Über eine Abnahme der Leukocyten und des Immunglobulin-G-Titers von Affen, denen T2-Toxin appliziert worden war, haben JAGEDESAN et al. (1981) berichtet.

Eine Menge von 0,2 ng/ml T2-Toxin war in vitro in der Lage, bei stimulierten Maus-Lymphocyten die DNS-Synthese um 73% zu hemmen, im Gegensatz zu nur 11% bei Ratten-Hepatomzellen (ROSENSTEIN und FRAYSSINET, 1983). Bei chronischer Verabreichung des T2-Toxins an Kälber (0,6 mg/kg KGW; 43 Tage) wurde eine Abnahme der Zellteilungsrate von Lymphocyten beobachtet. Die chemotaktische Wanderung der Neutrophilen wurde ebenso gehemmt, so daß die Abwehrreaktion des Körpers durch Phagozytose verlangsamt wurde. Dagegen hemmt T2-Toxin kaum die RNS-Synthese (THOMPSON und WANNEMACHER, 1984). Die Wirkung des T2-Toxins bei Mäusen auf die DNS und Proteinsynthese wurde von ROSENSTEIN und FRAYSSINET (1983) wie folgt beschrieben: Hemmung der Synthese in Milz, Knochenmark und Thymus, wobei beim letzteren eine Gewichtsabnahme zu beobachten war. In der Leber war die Proteinsynthese zuerst erhöht, ab dem siebenten Behandlungstag aber wieder gesunken.

WEI et al. (1972) ermittelten bei Ratten für T2-Toxin eine Empfindlichkeitsgrenze von 0,05 µg/spot im Hauttoxizitätstest. Im Zytotoxizitätstest (Humankaryoblastzellen) liegt die Nachweisgrenze bei etwa 1 µg/ml (EPPLEY, 1975). T2-Toxin besitzt keine bakteriostatische Aktivität, wirkt aber fungistatisch und phytostatisch. Sechs von elf getesteten Pilzen (u.a. *Rhodotorula rubra* und *Penicillium digitatum*) wurden in ihrem Wachstum durch Zugabe von T2-Toxin gehemmt (BURMEISTER und HESSELTINE, 1970).

Im Gegensatz zu anderen Mykotoxinen wie Aflatoxine ist T2-Toxin wahrscheinlich nicht karzinogen (MARARAS et al., 1969). OHTSUBO und SAITO (1977) bestätigten diese Vermutung mit Langzeitversuchen bei Mäusen. Nach vier Wochen Fütterung mit T2-Toxin-Konzentrationen von 5, 10 und 15 ppm, fanden sie in der Speiseröhre keine besondere Veränderungen. Im Vormagen war eine diffuse Hyperkeratose, aber keine Papillombildung festzustellen.

Für die biologische Aktivität des T2-Toxins ist vermutlich der Epoxidring bei C-12,13 verantwortlich. Eine Hydrierung der Doppelbindung bei C-9,10 wirkt sich nur schwach auf die Toxizität aus, dagegen wird die biologische Aktivität durch Zerstörung des Epoxidrings bei C-12,13 vermindert (UENO, 1977). FORSELL et al. (1985) berichten über die Auswirkung der Hydrolyse des T2-Toxinmoleküls auf dessen immunsuppressive Aktivität. Für eine 50%ige Hemmung der Thymidinaufnahme in stimulierten Lymphocyten wurden 1,5 ng/ml T2-Toxin, 3,4 ng/ml HT2-Toxin und je 150 ng/ml T2-Triol und T2-Tetraol gebraucht. Für die Toxizität ist es nicht wesentlich, wenn T2-Toxin zu HT2-Toxin hydrolysiert wird, wohl aber, wenn es zu T2-Triol und T2-Tetraol abgebaut wird. Ebenso fand OLDHAM (1980), daß die Hydrolyse von T2-Toxin zu T2-Tetraol die Toxizität des Mykotoxins reduzierte.

2.2.3 Metabolismus

T2-Toxin wird im Körper schnell resorbiert und metabolisiert. HT2-Toxin wird von verschiedenen Autoren als ein Hauptmetabolit von T2-Toxin neben dem 3'-Hydroxy-T2-Toxin und 3'-Hydroxy-HT2-Toxin angesehen (ELISON und KOTSONIS, 1974; OHTA et al., 1977; YOSHIKAWA et al., 1984; VISCONTI und MIROCHA, 1985; CORLEY et al., 1985; CORLEY et al., 1986; KNUPP et al., 1986). HOFMANN (1980) fand bei Hühnern zweieinhalb bis drei Stunden nach oraler Gabe von T2-Toxin die maximale Konzentration in der Leber. Nach viereinhalb Stunden war nur noch HT2-Toxin nachweisbar, das einen dem T2-Toxin ähnlichen, aber zeitlich verschobenen Metabolismus zeigte. KABILKA (1986) stellte bei einem in vitro Versuch in den S-9 Leberüberständen fest, daß T2-Toxin innerhalb von 2 h vollständig abgebaut worden war. Der Anteil des HT2-Toxins an den analysierten Metaboliten betrug 80%. Bei Wiederholung des Versuches mit HT2-Toxin wurde es zu 90% wiedergefunden.

T2-Toxin wird durch Leberenzyme des Menschen an der C-4 Position zu HT2-Toxin deacetyliert (ELISON und KOTSONIS, 1974). Dies konnte von WEI und CHU (1985) durch Zusatz eines Esteraseinhibitors indirekt bestätigt werden. In Anwesenheit dieses Inhibitors wurde 3'-Hydroxy-T2-Toxin als einziger Metabolit nachgewiesen. Die Deacetylierung an C-4 scheint jedoch die Zytotoxizität nicht zu vermindern (ELISON und KOTSONIS, 1974; OHTA et al., 1978).

ROBISON et al. (1979) fütterten eine Kuh täglich mit 182 mg T2-Toxin an 15 aufeinander folgenden Tagen. T2-Toxin wurde in Mengen von 10 bis 160 ppb in der Milch nachgewiesen. Die Nachweisgrenze, die mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie-SIM mode (selected ion monitoring mode) nach Extraktion der Kuhmilch ermittelt werden konnte, lag zwischen 5 und 10 ppb.

YOSHIZAWA et al. (1981) berichten über einen Versuch mit einer laktierenden Kuh, der radioaktiv markiertes T2-Toxin p.o. verabreicht worden war. Nach 72 h waren 72% der aufgenommenen Radioaktivität im Stuhl, 29% im Urin und nur 0,2% in der Milch ausgeschieden. 12 h nach Verabreichung von 180 mg T2-Toxin betrug die nicht metabolisierte Toxinkonzentration 2 ppb in der Milch. Chromatographische Analysen ergaben, daß T2-Toxin im Körper schrittweise bei C-4, C-8 und C-15 deacetyliert und zu HT2-Toxin, 4-Deacetyl-neosolaniol und T2-Tetraol metabolisiert wird, wobei noch drei unbekannte Metaboliten (bezeichnet als TC-1, TC-3, TC-6) entstanden. Diese beiden Metaboliten TC-1 und TC-3 wurden auch bei Versuchen mit Broilern nachgewiesen (YOSHIZAWA et al., 1980). 1982 wurden die beiden unbekannten Metaboliten (TC-1, TC-3) von YOSHIZAWA und seinen Mitarbeitern als 3'-Hydroxy-T2-Toxin und 3'-Hydroxy-HT2-Toxin charakterisiert.

VISCONTI und MIROCHA (1985) konnten ebenfalls 3'-Hydroxy-T2-Toxin, 3'-Hydroxy-HT2-Toxin und HT2-Toxin als Hauptmetaboliten in den Kloakenexkrementen von Hühnern feststellen.

Der Metabolismus von T2-Toxin nach YOSHIZAWA et al. (1984) ist in Abb. 1 dargestellt.

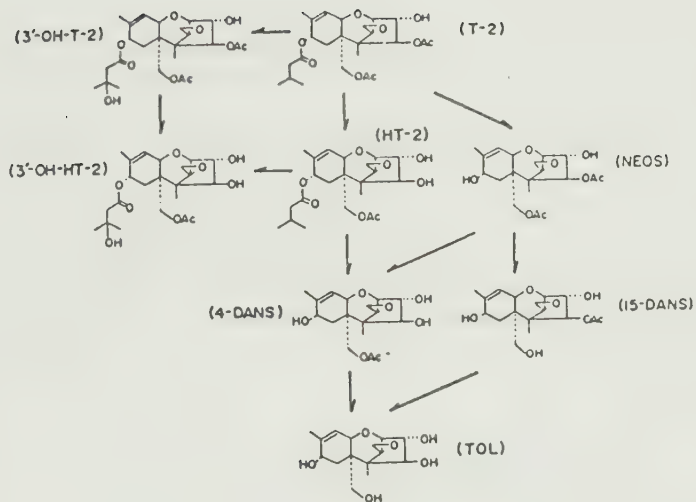


Abbildung 1: In vitro Metabolismus von T2-Toxin

3'-OH-T2 = 3'-Hydroxy-T2-Toxin

3'-OH-HT2 = 3'-Hydroxy-HT2-Toxin

HT2 = HT2-Toxin, NEOS = Neosolaniol,

DANS = Deacetylneosolaniol, TOL = T2-Tetraol

2.3 Verfahren zum Nachweis von T2-Toxin.

Eine Reihe von empfindlichen, meist aber unspezifischen biologischen Nachweismethoden ist in Tab.5 angegeben. Spezifische Nachweise sind mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden erreichbar, die unabdingbare Voraussetzungen für die Erforschung der Mykotoxine waren. Diese Verfahren erfordern eine z.T. sehr aufwendige Probenaufbereitung zur Entfernung von Störsubstanzen, die den Nachweis erheblich beeinflussen können (EPPLEY, 1979; BAUER, 1980). Außerdem weisen sie nicht immer die erwünschte Empfindlichkeit auf. Nachteilige Probenaufbereitung und z.T. auch geringere Empfindlichkeit waren Gründe, sich -angeregt durch Fortschritte in der Immunologie- zunehmend mit der Entwicklung immunologischer Methoden zu beschäftigen.

2.3.1 Physikalisch-chemische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Dieses Verfahren beruht auf der Trennung der vorgereinigten Extrakte auf mit Kieselgel beschichteten Glasplatten durch spezielle Fließmittel. Als Referenz dienen die Standardtoxine und deren unterschiedliche Laufhöhen (BAUER, 1980). Diese Methode ist sehr nützlich für den qualitativen Nachweis der Trichothecene (PATHRE und MIROCHA, 1977). T2-Toxin zeigt allerdings keine nennenswerte Absorption im UV und sichtbaren Bereich des Spektrums und muß deshalb derivatisiert werden. Die Derivatisierung erfolgt nach dünnschichtchromatographischer Trennung durch Besprühen mit Schwefelsäure und nachfolgendes Erhitzen. Das Derivat zeigt eine grüngelbe Fluoreszenz (UENO et al., 1973).

Tabelle 5: Biologische Nachweismethoden von T2-Toxin

Biologisches System	Prinzip	Nachweisgrenze	Referenz
Kaninchen	Hauttoxizität	0,01 µg/Test	Chung et al., 1974
Ratten	Hauttoxizität	0,05 µg/Test	Wei et al., 1972
Salinenkrebslarven (Artemia salina L.)	LD ₅₀	0,1-0,3 µg/ml	Eppley, 1975; Müller u. Lepom, 1985
Mitogen stimulierte Human-Lymphocyten	50%ige Hemmung der Thymidin- aufnahme	1,5 ng/ml	Forsell et al., 1985
Kaninchen-Retikulo- cyten	50%ige Hemmung der Protein- synthese	0,03 µg/ml	Ueno et al., 1973
Maus-Fibroblasten	50%ige Reduzie- rung der Zell- dichte	0,25-1,7 µg/ml Probenextrakt	Abbas et al., 1984
Rodotorula rubra	Zytotoxizität (50%ige Reduzie- rung der Germina- tionsphase	0,5 µg/ml	Burmeister u. Hesseltine, 1970

Tabelle 6: Physikalisch-chemische Nachweismethoden von T2-Toxin

Methode	Extraktion	Reinigung	Nachweisgrenze (ppb)	Referenz
DC	Methanol/Wasser (95+5)		100-500	Kamimura et al., 1981
DC	Chloroform		15	Hofmann, 1980
DC	Ethylacetat	Silicagel Säule	200	Ilus et al., 1981
GC-FID	Ethylacetat	Silicagel Säule	200	"
GC-ECD	Methanol/Wasser (95+5)	Amberlite XAD-4 Säule	80	Kamimura et al., 1981
GC-FID	Methanol/Wasser (95+5)	Amberlite XAD-4 Säule	200	"
GC-ECD	Methanol/Wasser (1:1)	Kieselgel Säule	25-50	Gareis, 1982
GC-FID	Methanol/Wasser (1:1)	Kieselgel Säule	50-125	"
GC-MS	Ethylacetat	präparative DC	76	Mirocha et al., 1976
GC-MS	Methanol	präparative DC	5-10	Robison et al., 1979
GC-MS	Ethylacetat	Sep-Pak C-18	5	Chaytor u. Saxby, 1982

Die DC-Methoden unterscheiden sich hauptsächlich durch die Wahl des Laufmittels voneinander. NOWOTNY und Mitarbeiter (1982) haben mit einer DC-Schnellbestimmungsmethode den Nachweis von 22 Mycotoxinen, darunter T2-Toxin, geprüft. Sie ermittelten eine Nachweisgrenze für T2-Toxin von 4 ppm bei einer Wiederfindungsrate von 50-60%. ILUS et al. (1981) beschrieben eine DC-Methode, mit der T2-Toxin bis 0,2 mg/kg Futter nachgewiesen werden kann. Für die exakte Analyse wurde hier jedoch die Gaschromatographie herangezogen.

Gaschromatographie (GC), Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS): Eine Übersicht über den T2-Toxin Nachweis mittels GC und GC-MS gibt UENO (1983). Hier werden die vorgereinigten Proben derivatisiert, an einer stationären Phase getrennt und im Detektor anhand der Signalintensität quantifiziert. Der qualitative Nachweis erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten mit Standardtoxinen.

Die Tab.6 gibt eine Übersicht über die physikalisch-chemischen Nachweismethoden für T2-Toxin.

2.3.2 Immunologische Nachweise

T2-Toxin ist eine Substanz mit niedrigem Molekulargewicht (MG 466) und kann deshalb im Organismus keine Bildung von Antikörpern induzieren. Um es immunogen wirksam zu machen muß es als Hapten an einen Proteinträger gekoppelt werden. Da T2-Toxin aber keine reaktive Gruppe zur direkten Kopplung an ein Protein aufweist, ist zuerst seine Überführung in ein kopplungsfähiges Derivat erforderlich.

Zum ersten Mal wurden spezifische Antikörper gegen T2-Toxin von CHU et al. (1979) gewonnen. Nach Immunisierung von Kaninchen wurden die spezifischen Antikörper mit radioaktiv markiertem T2-Toxin nachgewiesen. Für die Spezifität des Antikörpers hat der Isovalerylrest bei C-8 eine hervorragende determinierende Bedeutung. So sind auch Kreuzreaktionen mit HT2-Toxin von 17,5%

verständlich. Neosolaniol und T2-Tetraol, die bei C-8 eine Hydroxylgruppe aufweisen, reagierten kaum mit dem Antikörper.

In der Tab.7 sind die immunologischen Nachweismethoden für T2-Toxin aufgeführt, die im folgenden besprochen werden.

2.3.2.1 Radioimmunoassay (RIA).

LEE und CHU (1981 a, 1981b) berichten über eine serologische Methode, mit der T2-Toxin im Getreide bzw. in Körperflüssigkeiten in Konzentrationen von 1-2,5 ppb bzw. 0,5-2,5 ppb nachgewiesen werden kann. T2-Toxin wurde dabei nach WALLACE et al. (1977) radioaktiv markiert. Die mit käuflichen Kieselgelkartuschen vorgereinigte Probe wurde mit radioaktiv markiertem freien T2-Toxin und den von CHU et al. (1979) gegen T2-Toxin hergestellten Antikörpern inkubiert. Nach Ammoniumsulfatfällung der Antikörper wurde die Radioaktivität des an die Antikörper gebundenen T2-Toxins gemessen. Anhand einer Standardkurve wurde die Menge des in den Proben befindlichen T2-Toxins ermittelt.

Ein in der Praktikabilität verbesserter RIA ist von FONTELO et al. (1983) beschrieben worden. Die Proben wurden ohne jede Vorbehandlung direkt im Test eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng/ml.

2.3.2.2 Enzymimmunoassay (EIA/ELISA).

Allgemeines:

Spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen können nach Markierung eines der Reaktionspartner mit einem Enzym schon in geringem Umfang durch die entsprechende Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Anwendung enzymmarkierter Antikörper und Antigene für serologische Nachweise wurde zum ersten Mal von ENGWALL und PERLMANN (1971) und von VAN WEEMEN und SCHUURS (1971) beschrieben.

Tabelle 7: Immunologische Nachweismethoden für T2-Toxin

Methode	Material	Extraktion	Reinigung	Nachweisgrenze (ppb)	Wiederfindungs- rate (%)	Referenz
RIA	Weizen	Methanol	Sep-Pak C-18	1	90-95	Lee u. Chu, 1981a
	Mais	Methanol	Sep-Pak C-18	2,5	78-85	"
RIA	Serum	Ethylacetat	Sep-Pak C-18	0,5	87-106	Lee u. Chu, 1981b
	Urin	Ethylacetat	Sep-Pak C-18	2,5	87-106	"
	Milch		Sep-Pak C-18	2,5	88-117	"
RIA	Serum	direkt eingesetzt		10	59,8-126,8	Fontelo et al., 1983
	Urin	direkt eingesetzt		10	59,8-126,8	"
ELISA				0,05		Peters et al., 1982
ELISA	Weizen	Methanol	Sep-Pak C-18	1	95-25	Pestka et al., 1981
	Mais	Methanol	Sep-Pak C-18	5	98-19	"
ELISA	Mais	Methanol/ Wasser (60:40)		0,05	30-60	Gendlof et al., 1984
ELISA	Urin		Sep-Pak C-18	0,2	73-82	Fan et al., 1984
	Serum		Sep-Pak C-18	1	51-82	"
	Milch		Sep-Pak C-18	0,2	80-83	"

Prinzipiell können die enzymimmunologischen Methoden wie folgt beschrieben werden:

Der homogene Immunoassay beruht auf dem Prinzip, daß die Enzymaktivität durch Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflusst wird und deshalb in diesem System keine Trennung von gebundenem und freiem Toxin nötig ist.

Beim heterogenen Verfahren ist dagegen eine Trennung von gebundenen und freien Reaktionspartnern nötig. Ein einfaches Verfahren ist, einen Reaktionspartner an einer festen Oberfläche zu adsorbieren, die nicht gebundenen Reagenzien durch einen Waschschrift zu entfernen und auf unterschiedliche Weise die Menge des gebundenen Reaktionspartner zu messen.

Für den Nachweis von Mykotoxinen werden kompetitive Verfahren verwendet. Dabei konkurrieren entweder freies und enzymmarkiertes Toxin (direkt) oder freies und an die Festkörperphase gebundenes Toxin (indirekt) gleichzeitig (simultan) oder nacheinander (konsekutiv) um die Antikörperbindungsstellen. Bei dem direkten Verfahren wird das spezifische Antiserum für das entsprechende Toxin an die feste Phase (Polystyroloberfläche) adsorbiert. Im nächsten Schritt wird ein Teil der Antikörperbindungsstellen mit freiem (gesuchtem), der Rest mit dem enzymmarkierten Toxin belegt. Die Menge des gebundenen enzymmarkierten Toxins kann anhand des Substratumsatzes gemessen werden und ist umgekehrt proportional der Konzentration des freien Toxins.

Bei dem indirekten Verfahren wird das entsprechende Toxin an Polystyroloberfläche adsorbiert. Im nächsten Schritt wird die Bindung des zugegebenen speziellen Antiserums durch Anwesenheit von freiem Antigen in der Probe oder in Standardlösungen verhindert. Durch Zugabe eines zweiten, für Immunglobulin spezifischen, enzymmarkierten Antikörpers kann die Menge der gebundenen Antikörper und damit indirekt die Menge des freien Toxins bestimmt werden.

Die konsekutive Anordnung beruht auf dem Prinzip, daß freies und enzymmarkiertes Toxin nacheinander um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren.

Das simultane Verfahren hat zum Prinzip, daß freies und enzymmarkiertes Toxin gleichzeitig um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Die Menge des gebundenen enzymmarkierten Toxins ist bei den beiden Methoden umgekehrt proportional der Konzentration des freien (nichtmarkierten) Toxins und kann anhand des Substratumsatzes gemessen werden.

Methoden:

Bei den enzymimmunologischen Nachweisen für T2-Toxin (Tab.7) werden die Tests entweder in direkter oder indirekter Anordnung durchgeführt. So entwickelten PESTKA et al. (1981) mit einem spezifischen Antikörper (CHU et al., 1979) und peroxidasemarkiertem T2-Toxin einen direkten ELISA, bei dem ohne Aufreinigung der Extrakte eine Nachweisgrenze für das Toxin in Weizen bzw. Mais von 5,0 ppb ermittelt wurde.

In einem von PETERS et al. (1982) beschriebenen indirekten ELISA kann T2-Toxin bis 50 pg/ml nachgewiesen werden. Das Hapten (T2-Toxin-Hemisuccinat) wurde an die Oberfläche von Mikrotitertablettskavitäten gebunden, indem es an Polylysin, das vorher an den Kunststoff adsorbiert worden war, gekoppelt wurde. Im nächsten Schritt wurde die Probe (freies Toxin) und T2-Toxin-Antiserum zugegeben, dessen Bindung an die Festkörperphase durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-Kaninchen-Immoglobulins nachgewiesen wurde. Bei Anwesenheit von freiem T2-Toxin in der Probe wird diese Bindung vermindert. Der Substratumsatz des an die Festkörperphase gebundenen Enzyms ist umgekehrt proportional der freien Toxinmenge.

GENDLOFF et al. (1984) untersuchten mit *Fusarium sporotrichoides* kontaminierten Mais mit Hilfe eines direkten ELISA auf den T2-Toxingehalt. Die Ergebnisse korrelierten gut mit den Werten, die mittels GC bestimmt wurden.

FAN et al. (1984) berichten über einen indirekten ELISA, mit dem sie in Harn, Milch und Serum nach Sep-Pak Vorreinigung 0,2 bis 1 ng/ml T2-Toxin nachweisen. Ohne Sep-Pak Reinigung lag die Nachweisgrenze bei 5, >10, >10 ng/ml in Serum, Milch und Harn.

Mit gegen T2-Toxin gerichteten, monoklonalen Antikörpern arbeiteten HUNTER et al. (1985). In einem kompetitiven Enzymimmunoassay wurde eine Nachweisgrenze von 50 ng/Test ermittelt. Die Kreuzreaktionen mit HT2-Toxin (25,5%) waren größer als die von CHU et al. (1979) für das polyklonale Kaninchen-Antiserum angegebenen.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Immunisierungsversuche

T2-Toxin ist eine niedermolekulare Substanz und für sich selbst nicht antigen wirksam. Werden solche auch als Haptene bezeichnete Substanzen an ein Trägerprotein gebunden, können sie als voll wirksame Antigene eine Immunantwort im Organismus hervorrufen.

3.1.1 Material

T2-Toxin, ebenso wie das T2-BSA-Konjugat wurde kommerziell von der Fa. Sigma bezogen. Von Herrn Dr. Risi, Institut für Biochemie, Universität Mainz wurden mit Zustimmung des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 500 mg T2-Toxin insbesondere für einen Fütterungsversuch zur Verfügung gestellt. Auch vom Institut für medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Universität München (Frau Prof. Dr. Gedek) erhielten wir T2-Toxin. Beiden Instituten bzw. dem BML sei auch auf diesem Wege herzlich gedankt.

Die Chemikalien wurden, wenn es nicht ausdrücklich anders angegeben ist, von der Fa. Merck in der Reinheitsstufe p.A. bezogen. Außer dem erwähnten Toxin und dem Konjugat wurden folgende Reagenzien, Lösungen und Geräte zur Herstellung von Antigenen, sowie für die Erstellung des ELISA eingesetzt:

- HT2-Toxin, Acetyl-T2-Toxin, T2-Triol, T2-Tetraol,
Verrucarin A, Roridin A, Diacetoxyscirpenol (DAS), (Sigma)
- Nivalenol und Neosolaniol (Mako)
- Bernsteinsäureanhydrid (Sigma)
- Humanserumalbumin (HSA) (Sigma)
- Ethyl-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDPC), (Sigma)
- Meerrettichperoxidase (HRP), Typ VI (Sigma)
- Tri-n-Butylamin (Sigma)

- Isobutylchlorcarbonat (Sigma)
- Dimethylformamid wasserfrei (DMF), (Aldrich)
- Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), (Sigma)
- N-Hydroxysuccinimid (N-Succ.), (Sigma)
- ortho-Phenylendiamin (OPD), (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)

- Phosphatpuffer (PBS):
0,01 mol Phosphatpuffer mit 0,12 mol NaCl, pH 7,2.
bei Zusatz von 1%igem fetalem Kälberserum (FKS) als FKS/PBS
bezeichnet.

- Beschichtungspuffer (CBP):
0,05 mol Natriumcarbonatbicarbonatpuffer, pH 9,6

- Waschlösung (NaCl/Tween 20):
0,12 mol NaCl mit 0,05% Tween 20

- Lösung zum Absättigen: Phosphatpuffer mit 2% FKS

- Substratlösung von GALLATI und BRODBECK (1982), pH 5:
0,05 mol Citrat-Phosphat-Puffer mit 2,5 mmol OPD und 4 mmol
 H_2O_2 (jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt)

- Fraktionensammler mit UV-Monitor (Isco)
- Differentialrefraktometer, LCD 202 (Bischoff)
- Mikroelisa Autoreader MR 580 (Dynatech)
- Täumelgerät, Reax 3 (Heidolph)
- Sephadex-G-25 Säule (Pharmacia)
- HPLC Säule, 20,5 x 250 mm (Bischoff)
- Sephadex-G-50 Säule (Pharmacia)
- 12 Kanalpipette (Dynatech)
- Mikrotiterplatten (Nunc)
- Kieselgel-60 Dünnschichtplatten (Merck)

Kaninchen der Rasse "Deutscher Stallhase" wurden im Alter von 12 Wochen gekauft. Sie wurden bei einer Standarddiät (Altromin) und Wasser gehalten.

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Überprüfung des dünnschichtchromatographischen Verhaltens und der Reinheit von T2-Toxin

Im Hinblick auf die Kontrolle der in folgenden Versuchen erforderlichen chemischen Reaktionen wurde ein dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren für T2-Toxin geprüft und optimiert. Die hier verwendeten Kieselgel-60 Platten wurden vorher imprägniert, indem sie 24 h in eine 3%ige Oxalsäure gestellt und anschließend an der Luft getrocknet wurden. Vor Gebrauch wurden sie 30 min bei 110°C im Trockenschrank aktiviert.

Hierzu wurden in Anlehnung an die Veröffentlichung von BAMBURG und STRONG (1971) verschiedene Fließmittel getestet:

Chloroform: Methanol (98:2)

Nachweis mit 20%iger H_2SO_4 (10 min/115°C):
gelbbrauner Fleck; R_f -Wert 0,35

Ethylacetat: Aceton: Methanol (50:50:1)

Nachweis mit 50%iger H_2SO_4 (10 min/115°C): bräunlicher Fleck,
Fluoreszenz im UV (366 nm); R_f -Wert 0,94

Chloroform: Isopropanol: Ethylacetat (95:5:5)

Nachweis w.o. : R_f -Wert 0,51

Ethanol: Ethylacetat: Aceton (1:4:4)

Nachweis w.o. : R_f -Wert 0,88

Toluol: Ethylacetat (25:75)

Nachweis w.o. : R_f -Wert 0,57

Für die folgenden Versuche wurde Toluol: Ethylacetat (25:75) als Fließmittel verwendet; da der R_f -Wert in der Mitte der Platte lag (bei 12 cm Laufhöhe) und somit die Abtrennung anderer Substanzen am besten gewährleistet war.

Das T2-Toxin aller drei Provenienzen erwies sich dünnschichtchromatographisch als rein.

3.1.2.2 Antigenherstellung

Herstellung von T2-Hemisuccinat (T2-HS)

Da T2-Toxin keine für die Kopplung an einen Proteinträger erforderliche reaktionsfähige Gruppe im Molekül aufweist, wird es zunächst mit Bernsteinsäureanhydrid in ein kopplungsfähiges Derivat überführt, entsprechend der Methode von CHU et al. (1979).

10 mg T2-Toxin wurden in 0,4 ml Pyridin gelöst und im Dampfbad mit 210 mg Bernsteinsäureanhydrid 4 h lang erhitzt. Anschließend wurde das Pyridin unter N_2 abgeblasen. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und viermal mit Aqua dest. gewaschen. Dann wurde die Chloroformphase am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Überprüfung der Reaktion erfolgte dünnschichtchromatographisch. Dabei ergaben sich als R_f -Werte für T2-Toxin 0,53 und für T2-HS 0,70 (Abb.2). Die Identifizierung wurde massenspektroskopisch vorgenommen (Abb.3). Auf eine Reinigung über präparative Platten wurde verzichtet, da die Umsetzung nahezu vollständig war.

Kopplung von T2-HS an Humanserumalbumin (HSA)

T2-HS wurde nach der Methode von CHU und UENO (1977) an HSA als Trägerprotein gekoppelt:

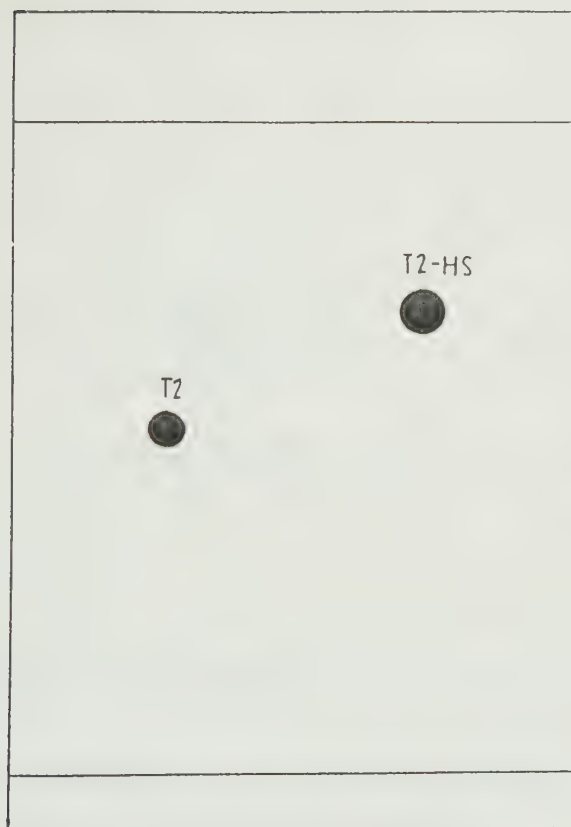


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Trennung des T2-Toxins
(R_f-Wert 0,53) von T2-HS (R_f-Wert 0,70) mittels
Dünnschichtchromatographie

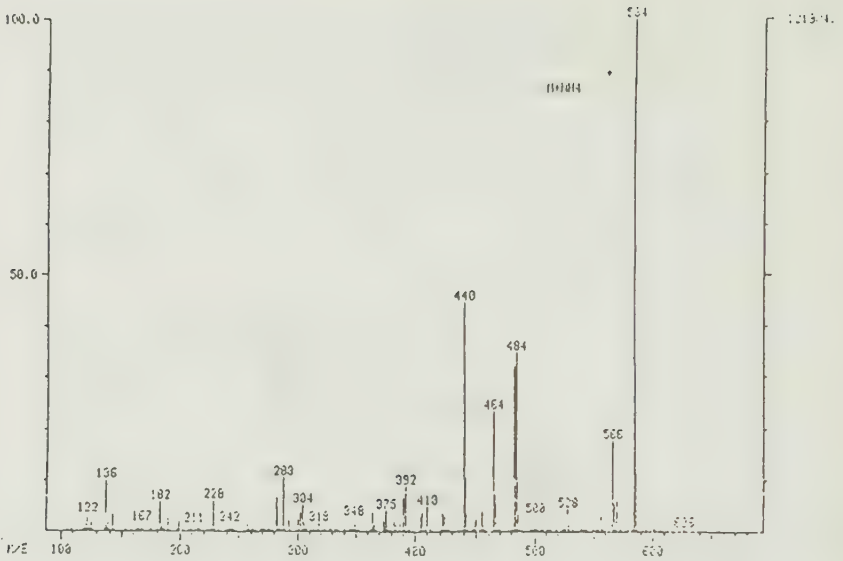


Abbildung 3 : Die Untersuchung des Umsetzungsproduktes mittels Massenspektroskopie.

Der Molekularpeak bei 566 ist charakteristisch für T2-HS. Der Peak bei 584 resultiert aus dem T2-HS-Molekül zuzüglich des Molekulargewichts des Ammoniumions, das hier zur Erstellung des Massenspektrogramms zugesetzt worden war.

10 mg T2-HS, gelöst in Dimethylformamid, wurden tropfenweise unter Rühren zu einer Lösung von 25 mg HSA und 150 mg Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDPC) in 12,5 ml Aqua dest. gegeben. Nach 10 min wurden weitere 50 mg EDPC zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 8 h lang bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert auf 6,5 gehalten wurde. Das Kopplungsprodukt wurde über eine Sephadex-G-50 Säule gereinigt. Eluiert wurde mit 0,9%iger NaCl. Am Monitor ergaben sich zwei Peaks (Abb.4). Dem ersten sind die Eiweißfraktionen zuzuordnen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (1951). Der zweite Peak entspricht den niedermolekularen Substanzen, von denen T2-HS dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden konnte. Die Eiweißfraktionen wurden gepoolt und gefriergetrocknet.

3.1.2.3 Immunisierung der Kaninchen

Fünf Kaninchen wurden nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1974) immunisiert. Pro Tier wurden 300 ug T2-HS-HSA (emulgiert in 0,5 ml 0,9% NaCl und 1,5 ml komplettem Freundschens Adjuvans) auf 30-40 Stellen verteilt, intradermal appliziert. Nach vier Wochen wurden jeweils 5 ml Blut entnommen, zwei Stunden zur Gerinnung bei 37°C im Wasserbad gehalten und anschließend 20 min zentrifugiert (3000 U/min).

Zwei weitere Kaninchen wurden auf die gleiche Weise mit dem käuflichen T2-HS-BSA-Konjugat immunisiert.

Die Kaninchen wurden in der 6., 10. und 14. Woche nach der Grundimmunisierung mit 300 ug T2-HS-HSA bzw. T2-HS-BSA restimuliert. Dazu wurde die Emulsion an zwei bis drei Stellen subkutan appliziert. Jeweils eine Woche nach der Restimulierung wurden Blutproben genommen; eine Woche nach der letzten Restimulierung wurden die Tiere durch Herzpunktion entblutet. Die gewonnenen Blutproben wurden bei 37 °C 2 h zur Gerinnung im Wasserbad gehalten und danach über Nacht im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Proben 2 x 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert.

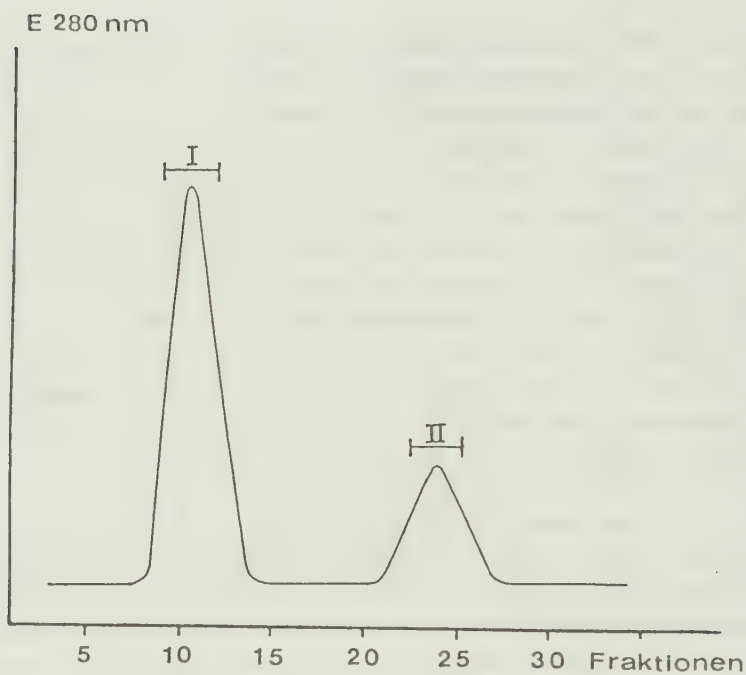


Abbildung 4: Graphische Darstellung der säulenchromatographischen
Abtrennung von T2-HS-HSA von ungekoppeltem T-HS
an Sephadex-G-50

Peak I: T2-HS-HSA

Peak II: T2-HS und andere niedermolekulare Substanzen

3.1.2.4 Aufbereitung der Seren

Die Seren wurden nach HEBERT et al. (1973) mittels Ammonium-sulfatfällung gereinigt. Zu 70 ml einer gesättigten Ammonium-sulfatlösung wurden 30 ml Aqua dest. zugegeben, bevor diese Lösung mit dem Serum im Verhältnis 1:1 unter Rühren gemischt wurde. Nach 4 h bei Raumtemperatur wurden die Seren zentrifugiert, das Präzipitat in etwas PBS gelöst und die Fällung noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Zentrifugat entsprechend der Ausgangsmenge des Serums in PBS gelöst und gegen PBS dialysiert, bis das Außendialysat sulfatfrei war (Kontrolle mit BaCl_2 unter leichter Ansäuerung). Die so gereinigten Antiseren wurden bei -20°C eingefroren.

3.2 Erstellung von Enzymimmunoassays (ELISA) gegen T2-Toxin

3.2.1 Material

Es wurden Materialien verwendet, die bereits unter 3.1.1. aufgeführt worden sind.

3.2.2 Methodik

Für die weiteren Versuche ein war mit einem Enzym markiertes T2-Toxin erforderlich. Als Enzym wurde Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Für die Kopplung der HRP an T2-HS wurden die Carbodiimidmethode und das gemischte Anhydridverfahren gewählt. Ferner mußte auch HT2-Toxin (Hauptmetabolit von T2-Toxin, siehe Kapitel 2.1.4) mit HRP markiert werden. Hier wurde die aktive Estermethode angewandt.

3.2.2.1 Markierung von T2-Toxin mit HRP mittels Carbodiimid-methode

T2-HS wurde nach der Methode von PESTKA et al. (1981) an HRP gekoppelt:

10 mg T2-HS, gelöst in Dimethylformamid (DMF), wurden tropfenweise unter Rühren zu einer Lösung von 25 mg HRP und 150 mg Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDPC) in 12,5 ml Aqua dest. gegeben. Nach 10 min wurden weitere 50 mg EDPC zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 8 h lang bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert auf 6,5 gehalten wurde. Das Kopplungsprodukt wurde über eine Sephadex-G-50 Säule gereinigt. Eluiert wurde mit 0,9%iger NaCl. Die Eiweißfraktionen wurden gepoolt und gefriergetrocknet.

3.2.2.2 Markierung von T2-Toxin mit HRP mittels gemischtem Anhydridverfahren.

Bei der gemischten Anhydridreaktion nach DEAN et al. (1972) wird durch Einwirken von Isobutylchlorcarbonat in einem wasserfreien Medium auf eine Carbonsäure ein gemischtes Anhydrid gebildet, wenn ein tertiäres Amin anwesend ist. Dieses gemischte Anhydrid reagiert im 2. Schritt der Reaktion mit freien Aminogruppen unter Bildung einer Peptidbindung.

Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

3 mg T2-HS wurden in 1 ml (DMF) gelöst und auf 10°C abgekühlt. Diese Lösung wurde mit 14,9 µl Tri-n-Butylamin versetzt. Nach Zugabe von 8,5 µl Isobutylchlorcarbonat und Abkühlen auf 4°C wurden 7,9 mg HRP in 1 ml Aqua dest. + 1 ml DMF, die eine Temperatur von 10°C hatten, dazugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,5 gehalten, während das Reaktionsgemisch 2 h gerührt wurde.

Zur Abtrennung der nicht gebundenen, niedermolekularen Reaktionspartner wurde das Reaktionsgemisch 72 h gegen PBS dialysiert. Das Kopplungsprodukt wurde in kleinen Mengen lyophilisiert.

Um das Verfahren hinsichtlich der molaren Verhältnisse von T2-Toxin und HRP abstimmen zu können, wurden drei Ansätze getestet, in denen die folgenden Mengen an T2-HS und HRP verwendet wurden:

- | | | |
|------------------|--------------------------------|------|
| 1. T2-HS 3,0 mg, | HRP 4,0 mg; molares Verhältnis | 50:1 |
| 2. T2-HS 1,5 mg, | HRP 3,9 mg; molares Verhältnis | 30:1 |
| 3. T2-HS 1,5 mg, | HRP 5,9 mg; molares Verhältnis | 20:1 |

3.2.2.3 Markierung von HT2-Toxin durch aktiver Esterbildung

Zuerst mußte HT2-Toxin in das kopplungsfähige Derivat HT2-Toxin-Hemisuccinat (HT2-HS) überführt werden:

5 mg HT2-Toxin wurden in getrocknetem Pyridin (0,5 ml) gelöst und mit 60 mg Bernsteinsäureanhydrid im Dampftopf 4 h erhitzt. Die Umsetzung wurde mittels DC überprüft, wofür mit Oxalsäure imprägnierte Kieselgel-60 Platten verwendet wurden. Das Fließmittel war Toluol: Ethylacetat (25:75). Dabei wurden als R_f -Werte für HT2-Toxin 0,21, für HT2-HS 0,51 ermittelt. Die Umsetzung war nahezu vollständig.

HT2-HS wurde mittel HPLC über eine präparative Säule (20,5 x 250 mm), gefüllt mit Lichrosorb RP 18 (10 µm Partikelgröße) aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Eluiert wurde mit einem Methanol/ Wasser Gemisch (55/45), die Detektion erfolgte mit einem Differentialrefraktometer. Das Produkt wurde anschließend nochmals mittels HPLC und DC überprüft und portioniert gefriergetrocknet.

Kopplung von HT2-HS an HRP

Aus dem HT2-Toxinderivat wurde zunächst ein aktiver Ester gebildet, der dann im zweiten Schritt der Kopplung mit freien Aminogruppen des Enzyms unter Bildung eines Amids reagierte.

Zu 7 μmol HT2-HS, das in 0,2 ml DMF gelöst worden war, wurde in einem wasserfreien Medium 15 μmol DCC (in 0,1 ml DMF) und 7 μmol N-Succ (in 0,1 ml DMF) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei 20 °C gerührt. Anschließend wurde 25 mg HRP, gelöst in 2 ml 0,13 M NaHCO_3 , langsam tropfenweise zugegeben und 20 h bei 20 °C weiter gerührt. Zum Schluß wurde der Ansatz auf eine Sephadex-G-25 Säule aufgegeben und das Kopplungsprodukt von den nicht gekoppelten niedermolekularen Reaktionspartnern getrennt (Abb.5).

3.2.2.4 Nachweis der Antikörper mit den Enzymkonjugaten

Mit den Antiseren wurden in Mikrotiterplatten in CBP Verdünnungsreihen angelegt (pro Kavität 100 μl), 3 h bei 37 °C inkubiert, anschließend gewaschen und ausgeschlagen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Platte mit 2%iger FKS/PBS 30 min abgesättigt. Danach wurde sie wieder gewaschen und ausgeschlagen. T2-HS-HRP wurde 1:400, HT2-HS-HRP 1:1000 in 1% FKS/PBS verdünnt und in dieser Konzentration auf die Platte verbracht (100 μl /Kavität). Anschließend wurde die Platte 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde pro Kavität 100 μl OPD-Substrat einpipettiert und die an die Festkörperphase gebundene Enzymaktivität anhand des Substratumsatzes bestimmt. Die Reaktion wurde nach 20 min durch Zugabe von 25 μl 1,25 mol H_2SO_4 gestoppt. Die Auswertung der Mikrotiterplatte erfolgte mit Hilfe eines Mikroelisa Auto-readers bei 490 nm.

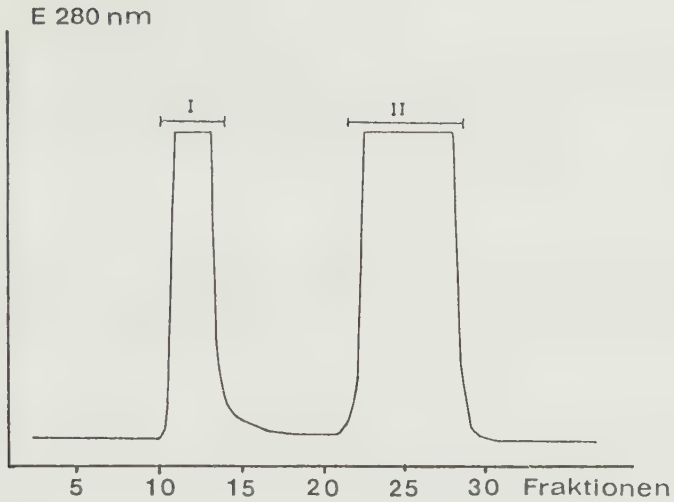


Abbildung 5: Säulenchromatographische Trennung des Enzymkonjugates (HT2-HS-HRP) von HT2-HS und anderen niedermolekularen Substanzen über Sephadex-G-25

Peak I: HT2-HS-HRP

Peak II: HT2-HS und andere niedermolekulare Substanzen

3.2.2.5 Nachweis von T2-Toxin im homologen Test

Das Serum des Kaninchens mit dem höchsten Antikörpertiter wurde für die weiteren Versuche verwendet. Zur Herstellung des Immunosorbens wurde eine Serumkonzentration eingesetzt, bei der 50-60% des enzymmarkierten Antigens durch die Antikörper gebunden wurden (Abb.6).

Zu Beantwortung der grundlegenden Frage, inwieweit freies T2-Toxin bei diesem enzymimmunologischen Verfahren in der Lage ist, enzymmarkiertes T2-Toxin an der Bindung mit dem Antikörper zu hindern, wurde folgender Versuch durchgeführt:

In die mit Antiserum beschichteten und mit 2%igem FKS/PBS abgesättigten Platten wurden wässrige T2-Toxinlösungen (100 μ l /Kavität in 10% MeOH/PBS) in den Konzentrationen von 1 μ g, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg und 1 pg pro ml pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf dem Taumler wurden die Lösungen abgesaugt und die Kavitäten mit T2-HS-HRP in einer Verdünnung von 1:400 in 1% FKS/PBS beschickt (100 μ l/Kavität). Nach 1 h auf dem Taumler wurde die Platte gewaschen und die gebundene Enzymaktivität anhand des Substratumsatzes bestimmt.

3.2.2.6 Nachweis von T2-Toxin im heterologen Test

Die Mikrotiterplatten wurden wie unter 3.2.2.5 beschrieben beschichtet, abgesättigt und mit T2-Toxin-Verdünnungen beschickt. Nach 1 h wurden die Lösungen abgesaugt und 100 μ l / Kavität HT2-HS-HRP, in 1%igem FKS/PBS 1:1000 verdünnt, zupipettiert (konsequente Testanordnung).

Dagegen wurden beim simultanen Test Toxinlösungen und Enzymkonjugat (1:500 verdünnt) gleichzeitig in die mit Antiserum

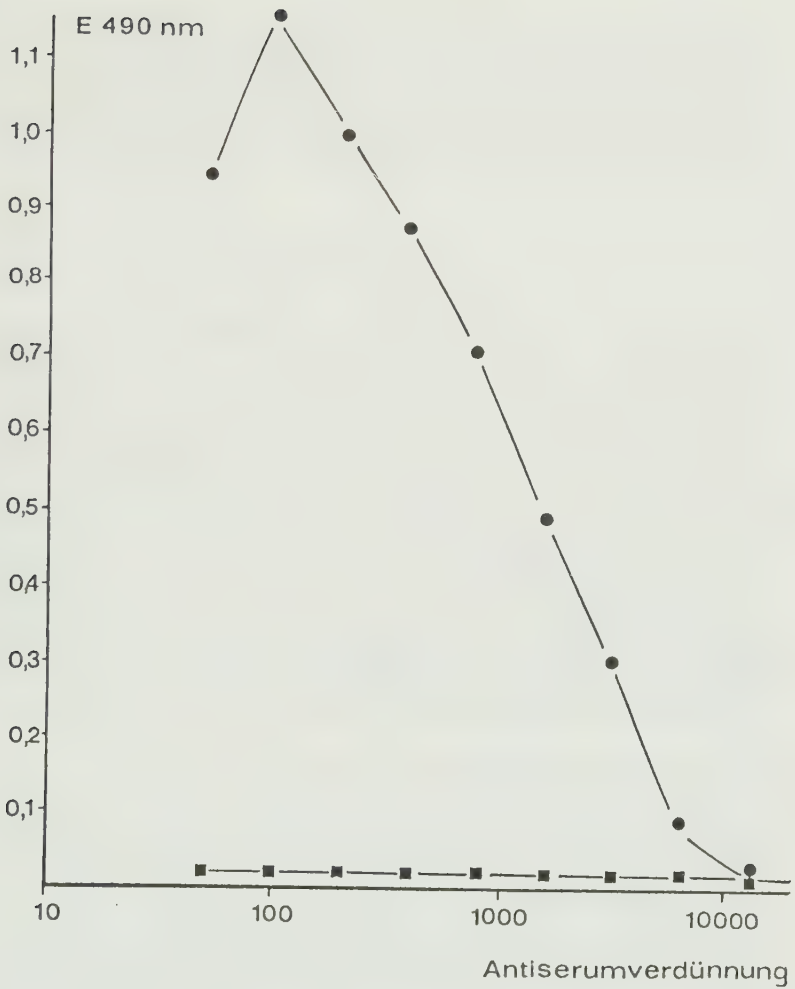


Abbildung 6: Titration des Antiserums mit dem höchsten Titer

(●) Kaninchen T2-Antiserum

(■) Kaninchen Präimmunsrum

beschichteten Mikrotitertablets pipettiert (je 50 μ l/Kavität) und auf dem Taumler 1 h bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wurde die Platte mit NaCl/Tween 20 Waschlösung gewaschen und ausgeschlagen. Die an die Festkörperphase gebundene Enzymaktivität wurde anhand des Substratumsatzes bei 490 nm photometrisch gemessen.

3.2.2.7 Ergebnisse

Alle Enzymkonjugate wurden durch das Antiserum gebunden. Diese Bindung konnte jedoch nicht durch Zugabe von freiem T2-Toxin gehemmt werden, sofern das T2-Toxin-Enzymkonjugat mittels Carbodiimidmethode hergestellt worden war. Beim Ansatz mit dem durch die gemischte Anhydridreaktion gekoppelten T2-HS-HRP konnte dagegen eine deutliche Hemmung erzielt werden. Bei der Herstellung dieses Enzymkonjugates mit dem gemischten Anhydridverfahren konnte die beste Bindung zwischen Immunosorbens und T2-HS-HRP mit dem molaren Verhältnis von 20:1 (Toxin:Peroxidase) erreicht werden (Abb. 7). Abb. 8 zeigt den Verlauf der im homologen Test ermittelten Standardkurve (1). Die Nachweisgrenze lag bei dieser Abstimmung bei 100 pg/ml T2-Toxin.

Mit HT2-HS-HRP wurde bei der konsekutiven Anordnung kein Unterschied gegenüber dem homologen Test festgestellt. Die Empfindlichkeit des heterologen Verfahren, vor allem im mittleren Bereich der Standardkurve war jedoch wesentlich besser (Abb.8, Standardkurve 2). Dagegen konnte neben der Empfindlichkeitssteigerung mit der simultanen Testanordnung (Abb.8, Standardkurve 3) der Testablauf vereinfacht und die Inkubationsdauer auf 60 min verkürzt werden. Mit dieser Testanordnung konnten weniger als 50 pg T2-Toxin/ml innerhalb 2 h nachgewiesen werden. Bei der verwendeten kompetitiven Testanordnung ist die gebundene Enzymaktivität umgekehrt proportional der in der Lösung befindlichen Toxinmenge.

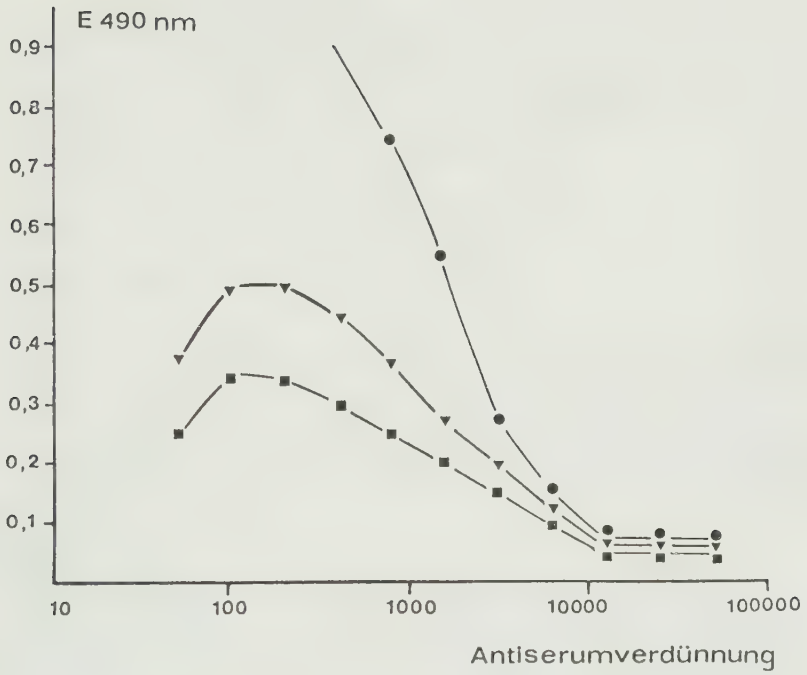


Abbildung 7: Bindung von T2-HS-HRP mit unterschiedlichen Kopplungsverhältnissen von T2-HS zu HRP an die Festkörperphase

(■) molares Verhältnis 50:1
(▼) " " 30:1
(●) " " 20:1

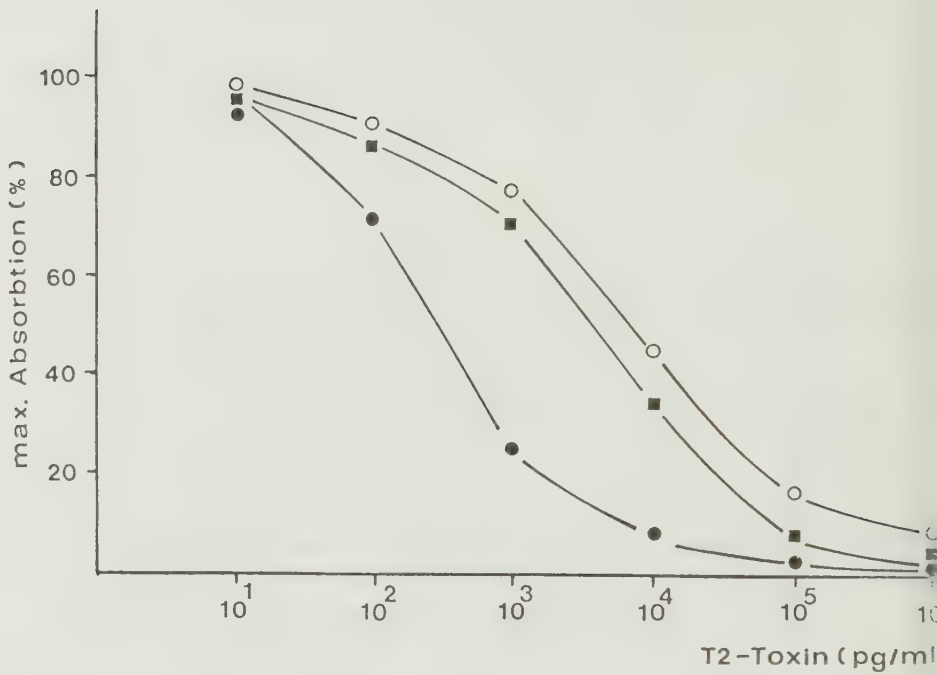


Abbildung 8: ELISA Standardkurven für T2-Toxin

- (O) 1. T2-Antiserum und T2-HS-HRP (konsekutiv)
- (■) 2. T2-Antiserum und HT2-HS-HRP (konsekutiv)
- (●) 3. T2-Antiserum und HT2-HS-HRP (simultan)

Die Zugabe von 1% fetalem Kälberserum zum Konjugat (BIERMANN und TERPLAN, 1980) ermöglichte eine doppelt so hohe Bindung des Konjugats an die Festkörperphase. Die Enzymaktivität der Produkte nach der Kopplung wurde durch Vergleich mit reiner Meerrettichperoxidase ermittelt. Die Restaktivität des Enzyms betrug 60%.

3.2.3' Standardisierung des ELISA für T2-Toxin

3.2.3.1 Abstimmung der Reaktionspartner

Zur Standardisierung des ELISA für T2-Toxin wurde entsprechend der vorhergehenden Ergebnisse enzymmarkiertes HT2-Toxin-Konjugat in simultaner Testanordnung verwendet. Zunächst wurden Verdünnungen von Antiserum und HT2-HS-HRP aufeinander abgestimmt. Als Standardmethode wurden folgende Bedingungen gewählt :

Das Antiserum , das in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren war, wurde in CBP 1:1000 verdünnt. Das Enzymkonjugat wurde in lyophilisiertem Zustand ebenfalls bei -20°C aufbewahrt, nach Bedarf in Aqua dest. gelöst und 1:500 in 1%igem FKS/PBS verdünnt. Von T2-Toxin, das in reinem Methanol aufgenommen worden war, wurde eine Standardreihe in 10% MeOH/PBS mit folgenden Toxinkonzentrationen (ng pro ml) angelegt:

20, 4, 0,8, 0,1, 0,032, 0,006. Die Verdünnungen wurden in jeweils sechs Paralellansätzen untersucht. Von den sechs Extinktionswerten jeder Verdünnungsstufe wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$) errechnet. Um die Nachweisgrenze zu ermitteln, wurde die doppelte Standardabweichung der Negativproben bestimmt und von deren Mittelwert ($\bar{x}$) abgezogen. Kleinere Extinktionswerte als dieser Grenzwert wurden als positiv gewertet.

3.2.3.2 Prüfung auf Kreuzreaktionen mit anderen Trichothecenen

Zur Abklärung der Spezifität des T2-ELISA wurde geprüft, inwieweit andere Trichothecene durch das Anti-T2-Antiserum gebunden werden und damit in der Lage sind, die Bindung des Toxin-Peroxidase-Konjugates an das Immunosorbens zu hemmen. Von den acht getesteten nicht makrocyclischen (T2-Toxin, Acetyl T2, HT2, T2-Triol, T2-Tetraol, Nivalenol, Diacetoxyscirpenol und Neosolaniol) sowie zwei makrocyclischen (Verrucaridin A und Roridin A) Trichothecenen wurden ab einer Konzentration von 100 µg/ml Reihenverdünnungen mit dem Faktor 10 hergestellt und jeweils sechs Parallelansätze im T2-ELISA untersucht. Es wurde jeweils die Toxinkonzentration bestimmt, durch welche die maximale Bindung der Enzymkonjugate auf 50% reduziert wurde (Inhibition Concentration (IC_{50})). Der für das T2-Toxin erhaltene Wert wurde gleich 100% gesetzt.

3.2.3.3 Ergebnisse

Die Nachweisgrenze des Tests lag bei dieser Versuchsabstimmung bei 50 pg/ml oder 2,5 pg pro Ansatz (Abb.9). Die Ergebnisse der Untersuchungen im heterologen Verfahren über Kreuzreaktionen sind in der Tab.8 im Vergleich zu den mit dem T2-Enzymkonjugat (homologer Test) ermittelten dargestellt. Kreuzreaktionen ergaben sich insbesondere mit Acetyl-T2-Toxin, HT2-Toxin und T2-Triol. Abgesehen von Acetyl-T2-Toxin, das in jedem Fall zu 100% reagierte, ergaben sich bei den übrigen deutlich geringere Werte, die je nach Art des Assays variierten.

3.3 Nachweis von T2-Toxin in Futtermitteln mittels ELISA

3.3.1 Material

Hierzu wurden verschiedene Getreidesorten (Weizen, Mais, Hafer und Gerste) in einem Mixer zerkleinert und pro Ansatz 2 g in die vorher mit 0,1 mol Salzsäure, Aqua dest. und anschließend mit Aceton gespülten Gläser abgewogen.

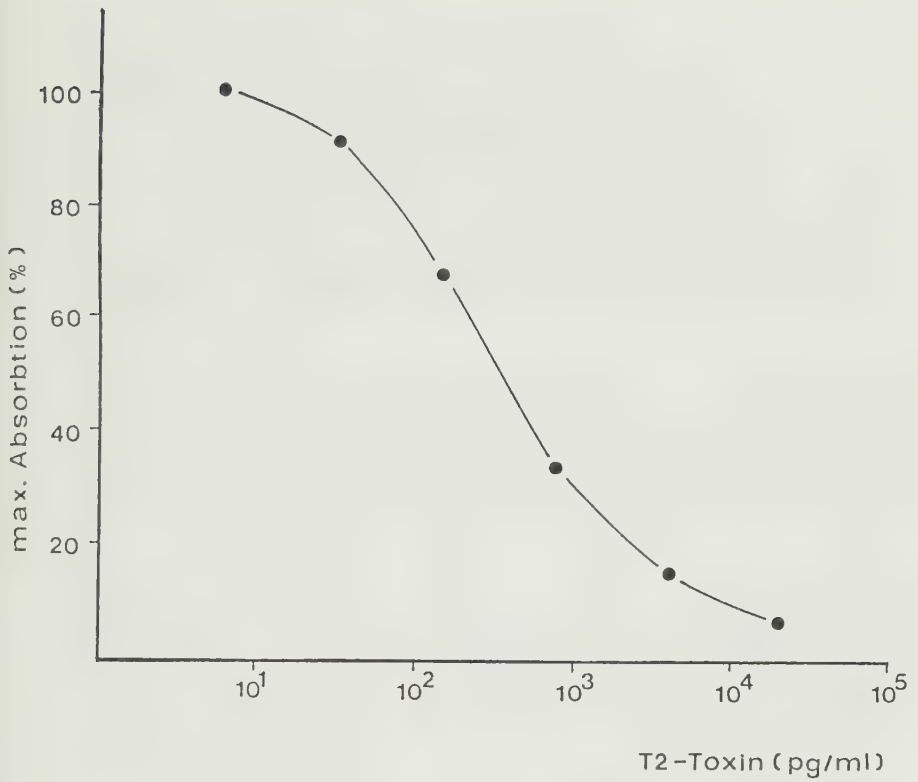


Abbildung 9: Standardkurve für den heterologen T2-ELISA in
simultaner Anordnung

Tabelle 8: Spezifität des homologen und heterologen T2-ELISA
Kreuzreaktionen mit anderen Trichothecenen.
(Toxinkonzentrationen, die eine 50%ige Hemmung
des Substratumsatzes ergaben (IC_{50}))

Trichothecene	Reaktion bezogen auf T2-Toxin in %		
	T2-HS-HRP konsekutiv	HT2-HS-HRP konsekutiv	simultan
T2-Toxin*	100.00 ^a	100.00 ^b	100.00 ^c
Acetyl-T2	100.00	>100.00	>100.00
HT2-Toxin	18.00	15.20	40.00
T2-Triol	2.40	1.60	3.50
T2-Tetraol	0.05	0.05	0.20
DAS	0.20	0.20	0.05
Neosolaniol	<0.05	<0.05	<0.01
Nivalenol	<0.05	<0.05	0.01
Verrucarín A	n.d.	n.d.	n.d.
Roridin A	n.d.	n.d.	n.d.

*: IC_{50} für T2-Toxin 50 ng/ml(a), 5 ng/ml(b), 0.64 ng/ml(c).
n.d.: nicht detektiert.

3.3.2 Methodik

Im Hinblick auf die praktische Anwendung des T2-ELISA wurden Proben von zerkleinertem Weizen, Mais, Hafer und Gerste mit T2-Toxin versetzt und die Wiederfindungsrate bestimmt. Für jede Toxinkonzentration wurden zehn Parallelansätze untersucht. Die Extraktion wurde mit reinem Methanol durchgeführt. Anschließend wurden die Extrakte entweder 1:10 mit PBS verdünnt und im Test eingesetzt oder wie folgt von Störsubstanzen getrennt:

Der Extrakt wurde auf 20% Methanol/Wasser verdünnt und durch eine Sep-Pak C-18 Kartusche gegeben (insgesamt 15 ml). Die Kartusche wurde mit 10 ml 20% Methanol/PBS gespült. T2-Toxin wurde mit 60% Methanol/Wasser eluiert. Das Eluat wurde 1:6 in PBS verdünnt und mittels ELISA untersucht.

Außerdem sollte geklärt werden, inwieweit andere Mykotoxine durch diesen Nachweis mit erfaßt werden. Die eingestetzten Toxinkonzentrationen waren folgende: T2-Toxin 5 ppb, Aflatoxin B₁ 5 ppb, Ochratoxin A 5 ppb, Diacetoxyscirpenol 10 ppb und Zearalenon 10 ppb.

3.3.3 Ergebnisse

Aus Tab.9 und 10 ist ersichtlich, daß T2-Toxin aus künstlich kontaminierten Weizen- und Maisproben (10 Ansätze für jede Toxinkonzentration) mit einer Nachweisgrenze von 5 bzw. 10 ppb und einer Wiederfindungsrate von 95,7 bzw. 68% nachgewiesen werden konnte. Dagegen traten bei der Untersuchung von Hafer- und Gersteproben Schwierigkeiten auf: Bei den toxinfreien Proben wurde eine Minderung des Substratumsatzes beobachtet, die falsch positive Ergebnisse bedingten. Diese Fehlerquelle konnte zum Teil mittels Vorreinigung über eine Sep-Pak C-18 Kartusche aufgehoben werden. Beim Weizen und Mais war dieses Reinigungs-verfahren nicht erforderlich.

Tabelle 9: T2-Toxinnachweis in künstlich kontaminierten Weizenproben

Toxinzusatz µg/kg	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0			
5	10	4,7	1,0	20,9	95,7
10	10	10,1	1,6	15,9	101,0
20	10	17,4	1,8	10,5	87,5
50	10	49,2	7,0	14,3	98,5

Tabelle 10: T2-Toxinnachweis in künstlich kontaminierten Maisproben

Toxinzusatz µg/kg	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0			
5	10	0			
10	10	6,8	3,4	49,9	68
20	10	19,2	2,4	12,7	96
50	10	61,6	2,9	4,7	123

Die übrigen in gleicher Weise im Versuch eingesetzten Mykotoxine zeigten mit dem T2-Toxin-Antiserum keine praktisch relevanten Kreuzreaktionen (Tab.11). Ein weiterer Reinigungsschritt mit Sep-Pak führte zwar zu einem geringen Verlust von T2-Toxin, wie am Beispiel von Weizenproben in Tab.12 gezeigt wird, erwies sich aber bei den Getreidearten, die den Test stören, als notwendig.

Tabelle 11: Prüfung der Spezifität des T2-ELISA
Kreuzreaktionen mit anderen Mykotoxinen.
(ermittelt an IC₅₀)

Mycotoxine	Kreuzreaktionen (%) bezogen auf T2-Toxin
T2-Toxin	100.000
Diacetoxyscirpenol	0,050
Aflatoxin B ₁	0,068
Zearalenon	0,007
Ochratoxin A	0,003

Tabelle 12: Wiederfindung des T2-Toxins (5 ppb) in Weizenproben
nach Extraktion ohne und mit Sep-Pak C-18.

Wiederfindungsrate (%)	
ohne Sep-Pak C-18	80,4-98,8
mit Sep-Pak C-18	59,4-80,4

3.4 Nachweis von T2- und HT2-Toxin in Milch und anderen Körperflüssigkeiten

3.4.1 Nachweis von HT2-Toxin mittels ELISA

Bei Berücksichtigung des T2-Toxin-Metabolismus (2.1.4) konnte vermutet werden, daß nach Toxinaufnahme fast nur Metaboliten, vor allem HT2-Toxin mit der Milch ausgeschieden werden. Aufgrund der relativ hohen Kreuzreaktivität des Anti-T2-Serums mit HT2-Toxin kann der T2-ELISA Test mit geringen Verlusten der Empfindlichkeit auch zum Nachweis von HT2-Toxin verwendet werden. Der Test wurde analog dem T2-Toxinnachweis (Kapitel 3.2.2.6) durchgeführt. Die Toxinkonzentrationen, der Standardreihe, waren folgende: 200, 40, 8, 1,6, 0,32, 0,06 ng HT2-Toxin pro ml. Als Nachweisgrenze wurde für HT2-Toxin 0,32 ng/ml ermittelt.

3.4.2 Vorversuche

3.4.2.1 Material

Hierzu wurden frische Milch, Harn und Serumproben (Rind) verwendet. Zunächst wurde die Kuhmilch zur Entfettung 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert, während Harn und Serum ohne Aufbereitung eingesetzt wurden.

3.4.2.2 Methodik

Zu Erstellung der Standardkurven wurden alle Körperflüssigkeiten 1:10 mit PBS verdünnt und beide Toxine, wie unter 3.2.3. und 3.5.1 beschrieben, darin gelöst. Den Körperflüssigkeiten wurden 0,5, 1,0, 2,0, und 5,0 ppb T2-Toxin bzw. 5, 10, 20, und 50 ppb HT2-Toxin zugesetzt und diese Proben, ebenfalls 1:10 in PBS verdünnt, im Test ausgewertet.

Tabelle 13: Nachweis von T2-Toxin in künstlich kontaminierten Rohmilchproben

Toxinzusatz ppb (ng/ml)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0,018			
0,5	10	0,341	0,043	12,5	68,2
1,0	10	0,676	0,090	13,2	67,6
2,0	10	1,953	0,115	5,9	97,6
5,0	10	3,720	0,180	4,8	74,3

Tabelle 14: Nachweis von HT2-Toxin in künstlich kontaminierten Rohmilchproben

Toxinzusatz ppb (ng/ml)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- (%) dungsrate (%)
0	10	0			
5	10	5,041	1,389	27,5	100,8
10	10	9,605	1,070	11,1	96,0
20	10	23,681	2,001	8,4	118,4
50	10	48,952	2,866	5,9	97,9

Tabelle 15: Nachweis von T2-Toxin in künstlich kontaminierten Rinderharnproben

Toxinzusatz ppb (ng/ml)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0			
0,5	10	0,480	0,080	17,5	97,3
1,0	10	0,824	0,080	9,7	82,4
2,0	10	2,050	0,175	8,5	102,7
5,0	10	3,881	0,383	9,8	77,6

Tabelle 16: Nachweis von HT2-Toxin in künstlich kontaminierten Rinderharnproben

Toxinzusatz ppb (ng/ml)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0			
5	10	4,134	1,334	32,3	82,7
10	10	11,011	1,325	12,0	110,0
20	10	19,222	1,779	9,2	96,1
50	10	52,808	2,953	5,5	105,6

Tabelle 17: Nachweis von T2-Toxin in künstlich kontaminierten Rinderserumproben

Toxinzusatz ppb (ng/ml)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0,171			
0,5	10	0,579	0,142	24,6	116,0
1,0	10	1,034	0,188	18,2	103,4
2,0	10	2,192	0,364	16,6	109,6
5,0	10	4,242	0,371	8,7	84,9

Tabelle 18: Nachweis von HT2-Toxin in künstlich kontaminierten
Rinderserumproben

Toxinzusatz ppb (ng/ml)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Variations- koeffizient (%)	Wiederfin- dungsrate (%)
0	10	0			
5	10	4,582	0,639	13,9	91,6
10	10	10,729	1,227	11,4	107,3
20	10	19,056	1,962	10,3	95,2
50	10	50,436	4,593	9,1	100,9

3.4.2.3 Ergebnisse

Wie aus Tabelle 13 bis 18 zu ersehen ist, läßt sich der T2- bzw. HT2-Toxinnachweis mittels ELISA in Milch, Harn und Serum ohne große Probenaufbereitung durchführen. Die Proben mußten dazu lediglich in PBS verdünnt werden. Die 1:10 Verdünnung in PBS hat sich in orientierenden Untersuchungen als notwendig erwiesen um unspezifische Hemmungen auszuschalten. Die Nachweiskgrenzen von T2- bzw. HT2-Toxin lagen in den Körperflüssigkeiten bei 0,5 bzw. 5 ng/ml.

3.5 Untersuchungen von Körperflüssigkeiten nach Verfütterung von T2-Toxin

3.5.1 Kurzzeitfütterungsversuche

Zwei laktierenden Kühen mit Milchleistungen von 16 (Tier I) bzw. 12 (Tier II) Liter pro Tag wurde T2-Toxin, gelöst in 50% Ethanol/Wasser, in einer einmaligen Menge von 0,3 (I) bzw. 0,5 (II) mg/kg KGW p.o. eingegeben. 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 und 96 h nach der Toxingabe wurden Milch und Harnproben entnommen. Die Proben wurden mit dem T2-ELISA untersucht. Die gesamte in der Versuchszeit ermolmene Milchmenge wurde ermittelt.

3.5.2 Langzeitfütterungsversuch

Nachdem in den vorherigen Versuchen die Toxinausscheidung nach einmaliger Applikation beobachtet worden war, sollte nun geklärt werden, inwieweit eine über längere Zeit andauernde Toxinverabreichung in geringeren Mengen die Ausscheidung mit der Milch beeinflußt. Dazu wurden zwei 25 Monate alte Jersey-Kühe mit Milchleistungen von 12 Litern pro Tag täglich zweimal mit 2 kg Kraftfutter und 3 kg Heu gefüttert (Wasser ad libitum). 30 mg T2-Toxin (0,1 mg/kg KGW,) wurden, gelöst in Ethanol, täglich über das Kraftfutter, das auf zwei Mahlzeiten verteilt wurde, an 21 hintereinanderfolgenden Tagen an Tier Nr.I verabreicht. Tier Nr.II diente als Kontrolle. Die zu jeder

Melkzeit entnommenen Milchproben wurden mit dem T2-ELISA auf ihren Toxingehalt untersucht.

3.5.3 Ergebnisse

Da einerseits T2-Toxin im Organismus rasch metabolisiert wird, andererseits das Antiserum, welches - wenn auch unterschiedlich - mit den Metaboliten, vor allem mit HT2-Toxin reagiert, werden in Körperflüssigkeiten im T2-ELISA immer mehrere Toxine erfaßt, ohne daß eine differenzierte Mengenangabe möglich ist. Die so ermittelte Toxinmenge muß daher korrekterweise als "T2-Toxin-Äquivalente" definiert werden.

Während des Kurzzeitfütterungsversuchs wurde bei beiden Tieren über Milch und Harn Toxinausscheidung beobachtet, deren Dauer von der Dosierung abhängig war (Tab.19). Während die Toxin-konzentrationen in der Milch nach 4 (Tier Nr.I) bzw. 8 (Tier Nr.II) h maximale Werte erreichten, war dies bei den Toxin-mengen pro Melkzeit bei Tier Nr.I nach 4, bei Nr.II nach 12 h der Fall (Tab.20). Die Rate der ausgeschiedenen "T2-Toxin-Äquivalente" in der Milch waren trotz unterschiedlicher Fütterungsdosen bei beiden Tieren nahezu gleich (0,05 bzw. 0,047 % der verabreichten Dosis). Die Toxinkonzentrationen waren in den Harnproben nach jeweils 4 h am höchsten. Da es nicht möglich war die gesamte Harnmenge zu erfassen, waren Berechnungen wie bei der Milch nicht möglich.

Die Ergebnisse des Langzeitfütterungsversuchs sind in der Tab.21 zusammengefaßt. Zu Beginn des Versuchs wurde in der Milch eine höhere Toxinkonzentration beobachtet, die trotz täglicher Verabreichung der gleichen T2-Toxin-Dosis im Laufe des Versuchs abnahm. Die Milchmenge sank während des Versuchs teilweise um mehr als die Hälfte ab, während sie beim Kontrolltier konstant blieb (durchschnittlich 11,0 Liter). Dies ist zumindest zum Teil auf Futterverweigerung und reduziertes Allgemeinbefinden zurück zu führen.

Tabelle 19: Toxinausscheidung in Milch und Harn bei einem Kurzzeitfütterungsversuch

Zeit (h) nach der Toxinverabreichung	"T2-Toxin-Äquivalente" in ng/ml			
	Harn		Milch	
	Tier I	Tier II	Tier I	Tier II
4	46,77	131,51	16,21	12,25
8	26,30	66,38	11,22	52,47
12	8,12	48,60	4,26	42,09
24	1,99	58,18	0,00	28,49
36	0,00	28,90	0,00	14,65
48	0,00	7,51	0,00	9,44
60	0,00	0,74	0,00	1,87
96	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 20: Pro Melkzeit mit der Milch ausgeschiedene Toxinmenge beim Kurzzeitfütterungsversuch

Zeit (h) nach der Toxinverabreichung	Milchmenge (l)		"T2-Toxin-Äquivalente"	
			in µg/Melkzeit	
	Tier I	Tier II	Tier I	Tier II
4	3,9	0,75	63,65	9,19
8	3,0	0,25	33,66	13,12
12	3,0	1,5	4,26	63,14
24	7,1	1,0	0,0	28,49
36	7,8	0,5	0,0	7,32
48	9,1	3,1	0,0	29,26
60	7,0	2,0	0,0	3,74
96	9,2	5,0	0,0	0,0

Tabelle 21: Milchmenge und Toxinausscheidung während
des Langzeitfütterungsversuchs.

Zeit	Milchmenge (l)	"T2-Toxin-Äquivalente" in ng/ml
1.Tag	11,8	18,3
2.Tag	12,4	10,3
3.Tag	11,6	7,2
4.Tag	11,3	8,1
5.Tag	11,0	9,9
6.Tag	11,5	7,8
9.Tag	6,0	2,2
10.Tag	5,5	2,6
12.Tag	4,0	1,9
15.Tag	4,5	0,0
19.Tag	6,5	2,4
22.Tag	5,5	0,0

4 DISKUSSION

Trichothecene, darunter das T2-Toxin gehören zu besonders wirkungsvollen Mykotoxinen, die von Fusarien-Arten im Getreide gebildet werden. Einerseits werden sie dadurch von Landwirtschaftlichen Nutztieren aufgenommen, woraus nicht nur Krankheiten resultieren, sondern auch die Kontamination der von diesen Tieren gewonnenen Lebensmittel erfolgen kann. Andererseits besteht die Gefahr, daß sie mit Lebensmitteln, die aus Zerealien oder unter Zusatz von diesen, wie diätetische Produkte, hergestellt wurden, von Menschen verzehrt werden. Da der Nachweis dieser Mykotoxine mit den physikalisch-chemischen Methoden sehr aufwendig ist, wurde nach der Möglichkeit gesucht, einen serologischen Nachweis zu führen. Die Fortschritte in der Immunchemie zeigten Wege auf, wie diese nicht immunogenen Substanzen nachgewiesen werden können. Dazu bot sich vor allem ein enzymimmunologisches Verfahren an.

Hier geht zunächst die Herstellung von Antikörpern voraus. Dazu mußte das T2-Toxin aktiviert werden, um an einem Proteinträger gebunden und dann als Antigen eingestzt werden zu können. T2-HS wurde als ein reaktives Derivat von T2-Toxin mit der Carbodiimidmethode an den Proteinträger zur Erstellung eines Antigens gekoppelt. Nach Immunisierung mit diesem Antigen und Serumgewinnung wurden die Antiseren mit Hilfe eines enzymmarkierten Antigens titriert. Die Enzymmarkierung des Toxins erfolgte ebenfalls mit der Carbodiimidmethode. Bei der Durchführung des enzymimmunologischen Tests stellte sich heraus, daß zwar das T2-HRP-Konjugat mit dem Antiserum reagierte, daß jedoch diese Bindung durch Zugabe von T2-Toxin nicht gehemmt wurde. Nach WOOD (1984) muß davon ausgegangen werden, daß bei der Kopplung des Toxins an das Trägerprotein mit der Carbodiimidmethode eine Nebenreaktion auftritt. Es entsteht gleichzeitig ein Produkt, das nicht nur das gewünschte Toxin als Hapten trägt, sondern auch ein Harnstoffderivat. Somit wurden Antikörper produziert, die sowohl mit dem Hapten als auch mit dem anderen Epitop reagieren.

Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf für die Kopplung des Toxins an Peroxidase statt der Carbodiimidmethode eine gemischte Anhydridreaktion angewandt. Das so hergestellte Enzymkonjugat wurde spezifisch durch Antiserum gebunden, wobei diese Bindung durch Zugabe von T2-Toxin in Abhängigkeit von der Konzentration reduziert wurde.

Zur Erstellung eines direkten enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für Haptene muß für diese kompetitiven Tests ein enzymmarkiertes Toxin als Reagenz zur Verfügung stehen. Dabei muß auch das Enzym-Toxin-Mengenverhältnis beachtet werden, denn je mehr Toxinmoleküle an das Enzym gebunden sind, um so mehr wird damit freies Toxin aus der Bindung verdrängt (VAN WEEMEN und SCHUURS, 1975). Daher wurde das Toxin mit verschiedenen Peroxidasemengen markiert und durch Titration mit dem Antiserum das geeignete T2-HRP-Konjugat für die weiteren Versuche ausgewählt. Die Mengenverhältnisse entsprachen im wesentlichen denen, die von BIERMANN und TERPLAN (1980) bei der Herstellung eines Aflatoxin B₁-Enzym-Konjugates eingesetzt wurden, nämlich 20:1.

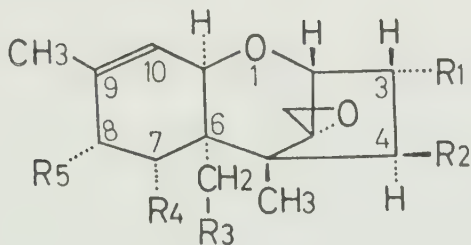
Die Bindung des homologen T2-Toxin-Enzym-Konjugates an Antikörper konnte durch Zugabe von freiem T2-Toxin gehemmt werden. Die daraus resultierende Nachweisgrenze lag bei 100 pg/ml. Es wurde dabei beobachtet, daß dieses Konjugat gegenüber freiem Toxin von den Antikörpern bevorzugt gebunden wurde. Dieses Ungleichgewicht wurde durch Einsatz des heterologen Konjugates von HT2-HS an HRP verringert. Ein solches Verfahren ist für den enzymimmunologischen Nachweis von T2-Toxin bisher noch nicht beschrieben worden. Mit einem ähnlichen Verfahren für den Nachweis von Aflatoxin M₁, bei dem statt des homologen Toxins Aflatoxin B₁ im Enzymkonjugat verwendet wurde, hatten MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) ein hochempfindliches Testsystem erhalten.

Bei der konsekutiven Testanordnung wurde in der Spezifität kein Unterschied gegenüber dem heterologen Konjugat festgestellt, während die Empfindlichkeit mit dem homologen im mittleren Meßbereich verbessert werden konnte. Beim simultanen Test konnte mit dem heterologen Konjugat eine Herabsetzung der Nachweisgrenze erzielt werden, beim homologen nicht. Mit dem heterologen Konjugat können im simultanen Verfahren weniger als 50 pg/ml T2-Toxin nachgewiesen werden. Diese Nachweisgrenze entspricht derjenigen, die von PESTKA et al. (1981), PETERS et al. (1982) und GENDLOFF et al. (1984) für den enzymimmunologischen Nachweis von T2-Toxin angegeben wurde.

Zur Charakterisierung des T2-Toxin-ELISA wurden zehn Trichothecene auf Kreuzreaktionen mit dem Antikörper getestet, von denen nur Acetyl-T2-Toxin und HT2-Toxin eine deutliche Reaktion zeigten (100 bzw. 40%). Für T2-Triol wurde eine Kreuzreaktion von 3,5% ermittelt, während die Bindung der anderen Trichothecene keine praktische Bedeutung hatte.

Für die Kreuzreaktionen sind folgende Strukturverhältnisse am Molekül maßgebend: Die Kopplung an das Trägerprotein zur Immunisierung erfolgte an der R_1 Position (Tab.22). Für die Spezifität des Antiserums sind vor allem die Gruppen entscheidend, die von dieser Bindungsstelle an das Protein weit entfernt und damit für den Antikörper zugänglich sind. Je mehr sich nun die Trichothecene an diesen Stellen, das sind vor allem die R_5 und R_3 Position, von dem T2-Toxin unterscheiden, desto geringer sind die Kreuzreaktionen des Antiserums mit diesen Toxinen. Dementsprechend waren keine Kreuzreaktionen mit Trichothecenen festzustellen, die im Gegensatz zu den kreuzreagierenden keinen Isovalerylrest in ihrer Struktur aufweisen. Ein Vergleich von Tab.22, in der die Strukturen von Trichothecenen dargestellt sind, mit Tab.8 aus der die Kreuzreaktionen ersichtlich sind, macht diese Zusammenhänge besonders deutlich. Bei einer Gegenüberstellung der Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchungen, die mit den verschiedenen Methoden und Enzym-

Tabelle 22: Strukturformeln der getesteten Trichothecene.



Name	R ₅	R ₄	R ₃	R ₂	R ₁
T2-Toxin	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OH
Acetyl T2	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OCOCH ₃
HT2-Toxin	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	OCOCH ₃	OH	OH
T2-Triol	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	OH	OH	OH
T2-Tetraol	OH	H	OH	OH	OH
DAS	H	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OH
Neosolaniol	OH	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OH
Nivalenol	=O	OH	OH	OH	OH
Verrucarín A	makrocyclisch				
Roridin A	- makrocyclisch				

konjugaten ermittelt wurden, ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung. Nur die Kreuzreaktion mit dem HT2-Toxin ist im simultanen Test deutlich größer als im konsekutiven. Die getesteten makrozyklischen Trichothecene (Verrucarin A, Roridin A) zeigten mit dem Antikörper keine Reaktionen.

Die vorliegende Methode bietet sich für einen groben Nachweis von T2-Toxin, genauer gesagt von "T2-Toxin-Äquivalenten", in Getreide und Körperflüssigkeiten an. Die in dieser Arbeit nicht im Detail beschriebenen Untersuchungen zeigten allerdings, daß Hafer- und Gersteproben nach der Extraktion mit reinem Methanol in einem zusätzlichen Schritt über Sep-Pak C-18 Kartuschen gereinigt werden müssen, um unspezifische Hemmungen zu eliminieren. Es bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen mit den beiden letztgenannten Getreidesorten. GAREIS und Mitarbeiter (1985) haben ebenfalls über die Störsubstanzen berichtet, die beim T2-Toxin-Nachweis im Hafer mittels Gaschromatographie aufgetreten sind. Diese konnten nicht vollständig von den Proben abgetrennt werden und führten somit zu falsch positiven Ergebnissen. Es ist allerdings fraglich, ob diese Substanzen mit denen identisch sind, die den T2-ELISA stören.

Es ist bekannt, daß einzelne Fusarienstämmen mehrere Trichothecene gleichzeitig bilden können. Mit dem T2-ELISA wird Acetyl-T2-Toxin, das im Getreide sehr oft vorkommt (KOTSONIS et al., 1975b), ebenso gut wie T2-Toxin nachgewiesen, während nur 40% der HT2-Toxinmenge erfaßt wird. Letzteres wurde sogar in einheimischen Getreidesorten neben T2-Toxin in Konzentrationen bis zu 0,7 mg/kg Hafer gefunden (GAREIS et al., 1985). Aufgrund der Kreuzreaktion des Antiserums mit HT2-Toxin kann dieses Toxin mit dem T2-ELISA in Mengen bis zu 12,5 bzw. 25 ppb in Weizen bzw. Mais nachgewiesen werden. Bei Körperflüssigkeiten betrug die Nachweisgrenze 5 ppb für HT2-Toxin, während T2-Toxin bis zu 0,5 ppb nachgewiesen werden kann.

Diese Ergebnisse deuten einerseits Einschränkungen an, was die Spezifität des T2-ELISA betrifft, andererseits können sie auch als Vorteil für einen Suchtest angesehen werden, zumal die Trichothecene selten vereinzelt im Getreide vorkommen. Erstrebenswert wäre allerdings ein Antiserum, das eventuell mit einem manipulierten Antigen gewonnen wird, das in den wesentlichen Seitenketten möglichst vielen Trichothecenen gleicht.

Gegenwärtig kann der T2-ELISA als ein Suchtest empfohlen werden, zumal seine Empfindlichkeit, die der physikalisch-chemischen Verfahren deutlich übersteigt. Im positiven Falle könnte eine Bestätigung mit einem Referenzverfahren erfolgen. Der Test würde einen großen Probendurchsatz ermöglichen und wäre auch von den Kosten um ein vielfaches preiswerter als die konventionellen Methoden. So reicht 1 ml Antiserum für etwa 1250 Probenuntersuchungen. Instabilität der Reagenzien (Antiserum, Konjugat etc.) wurde nicht beobachtet. Das HT2-Enzym-Konjugat wurde in lyophilisiertem Zustand aufbewahrt und war bisher (zwei Jahre) stabil. Eine einfache semiquantitative Bestimmung der positiven Proben kann schon mit dem bloßen Auge erfolgen.

T2-Toxin wird nach Verfütterung an Milchkühe schnell metabolisiert und mit der Milch nur in geringen Mengen ausgeschieden. Dies wurde von ROBISON et al. (1979) und YOSHIZAWA et al. (1981) mit physikalisch-chemischen Nachweismethoden nachgewiesen. Lediglich die Versuche von YOSHIZAWA et al. (1981), die mit radioaktiv markiertem T2-Toxin durchgeführt wurden - allerdings mit vorausgegangener Fütterung von unmarkiertem Toxin - sind mit dem vorliegenden Kurzzeitfütterungsversuch vergleichbar. Diese Autoren fanden 0,2 % des verabreichten Toxins wieder, im eigenen Versuch waren es ca. 0,05%. Die Erklärung für diesen Unterschied könnte in der Methode begründet liegen, daß mit dem T2-ELISA zwar auch Stoffwechselprodukte erfaßt werden ("T2-Toxin-Äquivalente"), jedoch nicht alle, wie das bei der Isotopenmethode der Fall sein dürfte.

Bei einer einmaligen Verabreichung von T2-Toxin wurde beobachtet, daß die Erhöhung der Dosis um geringe Mengen schon eine wesentlich länger anhaltende Toxinausscheidung zur Folge hatte, ohne allerdings die Ausscheidungsrate zu beeinflussen. Bei längerer Verabreichung geringerer Toxinmengen wurde nur an den beiden ersten Tagen des Versuchs eine erhöhte Toxinausscheidung in der Milch festgestellt (0,7 bzw. 0,4% der verabreichten Menge). Im Laufe des Versuchs nahm die Gesamtmenge des in die Milch ausgeschiedenen Toxins bis zum 9. Tag kontinuierlich ab und blieb dann etwa konstant. Dies könnte mit einer Steigerung des Entgiftungsprozesses in der Leber bzw. mit dem Auftreten von Metaboliten, die mit der angewandten Methode nicht erfaßt werden, erklärt werden. Wahrscheinlich trägt auch der starke Rückgang der Milchleistung zur Abnahme der Ausscheidungsrate bei.

Dieser Versuch wird gegenwärtig im Institut weiter ausgewertet, wobei die Harn-, Kot und Serumproben untersucht und - auch was die Milchproben betrifft - die Ergebnisse mit denen durch eine Referenzmethode erhaltenen verglichen werden. Inwieweit T2- oder HT2-Toxin in glucuronidierter Form (CORLEY et al., 1985; GAREIS et al., 1986) auch mit der Milch ausgeschieden werden, muß noch untersucht werden. Ebenso muß geklärt werden, ob diese Form der Toxine mittels der vorliegenden Methode nachgewiesen werden kann oder ob eine Behandlung der Probe mit Glucuronidase erforderlich ist. Auf jeden Fall sind weitere Untersuchungen des T2-Toxin-Metabolismus im Hinblick auf die enzymimmunologischen Nachweisverfahren erforderlich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Erstellung eines enzymimmunologischen Nachweises für T2-Toxin (T2-ELISA) wurde dieses Toxin mittels Carbodiimidmethode an das Trägerprotein (HSA) gekoppelt, Kaninchen mit diesem Antigen immunisiert und Antikörper gewonnen.

Für Antikörperbestimmung und T2-ELISA war die Herstellung eines mit Meerrettichperoxidase markierten T2-Toxins erforderlich. Die Enzymmarkierung erfolgte mit dem gemischten Anhydridverfahren. Neben T2-Toxin wurde auch HT2-Toxin mit dem Enzym konjugiert, wobei die aktive Estermethode angewandt wurde. Beide Konjugate wurden im ELISA eingesetzt, der sich mit dem HT2-Toxin-Konjugat als empfindlicher erwies. Als Nachweisgrenze in Pufferlösungen wurden 0,05 ppb ermittelt. Kreuzreaktionen traten mit Acetyl-T2-Toxin (100%), HT2-Toxin (40%) und T2-Triol (3,5%) auf.

Bei der Untersuchung von Getreide und Körperflüssigkeiten wurden mit dem T2-ELISA folgende Ergebnisse erzielt:

T2-Toxin konnte aus Weizen- und Maisproben ohne größeren Aufwand extrahiert und bis zu 5 bzw. 10 ppb nachgewiesen werden. In Milch, Harn und Serum betrugen die Nachweisgrenzen für T2-Toxin 0,5 ppb, für HT2-Toxin 5 ppb.

Untersuchungen zum Nachweis der Toxinausscheidung mit der Milch wurden nach einmaliger und 21 tägiger T2-Toxin-Verfütterung an Kühe durchgeführt. Nach einmaliger Verabreichung dauerte die Ausscheidung je nach Dosierung bis zu 60 h. Bei der längeren Verabreichung wurde im Laufe des Versuchs eine Abnahme der Toxinausscheidung festgestellt. Da eine spezifische Toxinermittlung mit dem T2-ELISA nicht möglich ist, wurden die gefundenen Werte als " T2-Toxin-Äquivalente" betrachtet..

6 SUMMARY

Developement and application of an enzyme immunoassay for the detection of T2-toxin

To develop an enzyme immunoassay for the detection of T2-toxin (T2-ELISA) this toxin was coupled to a carrier protein (HSA) by the carbodiimide method and rabbits were immunized with this antigen for the production of antibodies.

For determination of antibodies and the development of the T2-ELISA the preparation of a horseradish peroxidase labeled T2-toxin by was essential. The conjugation of the toxin to the enzyme was performed by a mixed anhydrid procedure. In addition HT2-toxin was also conjugated to the enzyme by an activated ester intermediate. Both conjugates were tested in the ELISA in which the HT2-toxin-conjugate reacted more sensitive. The detection limit in buffer solutions was 0,05 ppb. Cross reactions occured with Acetyl-T2-toxin (100%), HT2-toxin (40%) and T2-Triol (3,5%).

The examination of grain and body fluids gave the following results in the T2-ELISA:

T2-toxin could be extracted from wheat and corn samples by a simple method and detected at concentrations of 5 and 10 ppb, respectively. The detection limit in milk, urine and serum was 0,5 ppb for T2-toxin and 5,0 ppb for HT2-toxin.

Examinations concerning the detection of toxin excreted with milk were carried out after feeding T2-toxin to cows in single doses and during 21 days, respectively. After the application of a single dose the elimination lastet up to 60 h according to the dosage. During the longer application period a decrease in the toxin excretion was observed. Since a specific toxin de-

termination is not possible with the T2-ELISA, the obtained values were considered as "T2-toxin-equivalents".

7 LITERATUR

- ABBAS, H.K., W.T. SHIER und C.J. MIROCHA (1984):
Sensitivity of cultured human and mouse fibroblasts to
trichothecenes
J. Ass. Off. Anal. Chem. 67, (3) 607-610
- BAMBURG, J.R., N.V. RIGGS und F.M. STRONG (1968):
The structures of toxins from two strains of *Fusarium*
tricinctum
Tetrahedron 24, 3329-3336
- BAMBURG, J.R., F.M. STRONG und E.B. SMALLEY (1969):
Toxins from moldy cereals
J. Agr. Food Chem. 17, 443-450
- BAMBURG, J.R., und F.M. STRONG (1971):
12-13-epoxytrichothecenes
in: KADIS, S., A. CIEGLER und S.J. AJL.
Microbial Toxins vol. 7, p.207-292
Academic Press, New York and London
- BARNIKOL, H., S. GRUBER, A. THALMANN und H.L. SCHMIDT (1982):
Fusariotoxikosen beim Schwein durch Trichothecene mit
Beteiligung von Mutterkorn
Tierärztl. Umschau 37, 114-126
- BAUER, J. (1980):
Zur Leistungsfähigkeit mykotoxikologischer Untersuchungs-
methoden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 354-359
- DERSELBE (1982):
Mykotoxikosen in der tierischen Produktion-Bedeutung und
Diagnose (eine Übersicht)
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 301-307

BIERMANN, A. und G. TERPLAN (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 51-57

BRIAN, P.W. und J.C. MCGOWAN (1946):

Biologically active metabolic products of the mould

Metarrhizium glutinosum S. pope

Nature 157, 334

BURMEISTER, H.R. (1971):

T-2 toxin production by Fusarium tricinctum on solid substrate

Appl. Microbiol. 21, 739-742

BURMEISTER, H.R. und C.W. HESSELTINE (1970):

Biological assays for two mycotoxins produced by Fusarium
tricinctum

Appl. Microbiol. 20, 437-440

CHAYTOR, J. P. und SAXBY (1982):

Development of a method for the analysis of T-2 toxin in maize
by gas chromatography-mass spectrometry

J. Chrom. 237, 107-113

CHU ,F.S. und I. UENO (1977):

Production of antibody against aflatoxin B₁

Appl. Environ. Microbiol. 33, 1125-1128

CHU, F.S., S. GROSSMANN, RU-DONG WEI und C.J. MIROCHA (1979):

Production of antibody against T-2 toxin

Appl. Environ. Microbiol. 37, 104-108

CHUNG, W.C., M.W. TRUCKSESS, A.L. GILES und L. FRIEDMAN (1974):
Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-
irritating toxins in contaminated corn
J. Ass. Off. Anal. Chem. 57, 1121-1127

CORLEY, R.A., S.P. SWANSON und W.B. BUCK (1985):
Glucuronide conjugates of T-2 toxin and metabolites in swine
bile and urine
J. Agric. Food Chem. 33, 1085-1089

CORLEY, R.A., S.P. SWANSON, G.J. GULLO, L. JOHNSON,
V.R. BEASLEY und W.B. BUCK (1986):
Disposition of T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in intra-
vascularly dosed swine
J. Agric. Food Chem. 34, 868-875

CULLEN, D., E.B. SMALLEY und R.W. CALDWELL (1982):
New process for T-2 toxin production
Appl. Environ. Microbiol. 44, 371-375

DEAN, P.D.G., P.H. ROWE und D. EXLEY (1972):
Preparation of oestriol-6-(O-carboxymethyl) oxime and oestrone-
6-(carboxymethyl) oxime -bovine serum albumin conjugates
Steroids Lipids Res. 3, 82-89

ELLISON, R.A. und F.N. KOTSONIS (1974):
In vitro metabolism of T-2 toxin.
Appl. Microbiol. 27, 423-424

ENGVAL, E. und P. PERMANN (1971):
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay
of immunoglobulin G
Immunochemistry 8, 871-874

EPPLEY, R.M. (1975):

Mycotoxins. Methods for the detection of trichothecenes
J. Ass. Off. Anal. Chem. 58, 906-908

DERSELBE (1979):

Trichothecenes and their analysis
J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 824-829

FAN, S.L.T., G.S. ZHANG und F.S. CHU (1984):

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin
in biological fluids
J. Food Prot. 47, 964-967

FONTELO, P.A., J. BEHELER, D.L. BUNNER und F.S. CHU (1983):

Detection of T-2 toxin by an improved radioimmunoassay
Appl. Environ. Microbiol. 45, 640-643

FORSELL, J.H., J.R. KATELEY, T. YOSHIZAWA und J.J. PESTKA
(1985):

Inhibition of mitogen-induced blastogenesis in human
lymphocytes by T-2 toxin and its metabolites
Appl. Environ. Microbiol. 49, 1523-1526

FREEMAN G.G. und R.I. MORRISON (1948):

Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium*
roseum Link
Nature 162, 30

GALLATI, H. und H. BRODBECK (1982):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung
der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und
o-Phenylendiamin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 221-225

GAREIS, M. (1982):

Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis und zur
Bildung von Trichothecenen
Vet. Med. Diss. München

GAREIS, M., J. BAUER und B. GEDEK (1985):

Fusarientoxine in Futtermitteln. Nachweis und Vorkommen von
Trichothecenen
Tierärztl. Prax. Suppl. 1, 8-19

GAREIS, M., A. HASHEM, J. BAUER und B. GEDEK (1986):

Identification of glucuronide metabolites of T-2 toxin and
Diacetoxyscirpenol in the bile of isolated perfused rat liver
Toxic. Appl. Pharmac. 84, 168-172

GENDLOFF, E.H., J.J. PESTKA, S.P. SWANSON und L.P. HART (1984):
Detection of T2-Toxin in Fusarium sporotrichoides-infected corn
by enzyme-linked immunosorbent assay

Appl. Environ. Microbiol. 47, 1161-1163

HEBERT, G.A., P.L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for
the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera
Appl. Microbiol. 25 (1), 26-36

HOFMANN, G. (1980):

Untersuchung zum Carry-Over von T-2 Toxin bei Hühnern
Fleischwirtsch. 60, (10) 1908-1910

HSU, I.C., E.B. SMALLEY, F.M. STRONG und W.E. RIBELIN (1972):

Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a
lethal toxicosis in dairy cattle
Appl. Microbiol. 24, 684-690

HUNTER, K.W., A.A. BRIMFIELD, M. MILLER, F.D. FINKELMAN und F.S. CHU (1985):

Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin T-2

Appl. Environ. Microbiol. 49, 168-172

ILUS, T., M.L. NIKU-PAAVOLA und T.M. ENARI (1981):

Chromatographic analysis of Fusarium toxins in grain samples

Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11, 244-247

JAGADEESAN, V., C. RUKMINI, M. VIJAYARAGHAVAN und P.G. TULPULE (1981):

Immune studies with T-2 toxin: Effect of feeding and withdrawal in monkeys.

Fd. Chem. Toxic. 20, 83-87

JOFFE, A.Z. (1974):

Toxicity of Fusarium poae and F. sporotrichoides and its relation to Alimentary Toxic Aleukia

in: I.F.H. PURCHASE, Mycotoxins, p.229-262

Elsevier Scientific Publishing Company

Amsterdam, Oxford, New York

KABILKA, G. (1986):

Zum Nachweis von T-2 Toxin in Blutserum, Harn und Kot

Vet. Med. Diss. München.

KAMIMURA, H., M. NISHIJIMA, K. YASUDA, K. SAITO, A. IBE, T.

NAGAYAMA, H. USHIYAMA und Y. NAOI (1981):

Simultaneous detection of several Fusarium mycotoxins in cereals, grains and foodstuffs

J. Ass. Off. Anal. Chem. 64, 1067-1073

KNUPP, C.A., S.P. SWANSON und W.B. BUCK (1986):

In vitro metabolism of T-2 toxin by rat liver microsomes

J. Agric. Food Chem. 34, 865-868

KOTSONIS, F.N., R.A. ELLISON und E.B. SMALLEY (1975b):
Isolation of acetyl T-2 toxin from *Fusarium poae*.
Appl. Microbiol. 30, 493-495

KOTSONIS, F.N., E.B. SMALLEY, R.A. ELLISON und C.M. GALE
(1975a):
Feed refusal factors in pure cultures of *Fusarium roseum*
"graminearum".
Appl. Microbiol. 30, 362-368

LEE, SUNGSOO und F.S. CHU (1981a):
Radioimmunoassay of T-2 toxin in biological fluids
J. Ass. Off. Anal. Chem. 64, 684-688

LEE, SUNGSOO und F.S. CHU (1981b):
Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat
J. Ass. Off. Anal. Chem. 64, 156-161

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL
(1951):
Protein measurement with the folinphenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

LUTSKY, I., N. MOR, B. YAGEN und A.Z. JOFFE (1978):
The role of T-2 toxin in experimental alimentary toxic aleukia:
A toxicity study in cats
Toxic. Appl. Pharmac. 43, 111-124

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):
Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis
von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver
Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53-55

MARARAS, W.F.O., J.R. BAMBURG, E.B. SMALLEY, F.M. STRONG, W.L. RAGLAND und P.E. DEGURSE (1969):

Toxic effects on trout, rats and mice of T-2 toxin produced by the fungus *F.tricinctum* (Cd.) snyd. et hans

Toxic. Appl. Pharmac. 15, 471-482

McLAUGHLIN, C.S., M.H. VAUGHAN, I.M. CAMPBELL, C.M. WEI, M.E. STAFFORD und B.S. HANSEN (1977):

Inhibition of protein synthesis by trichothecenes

in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN

Mycotoxins in human and animal health, p.263-273

Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

MIROCHA, C.J. und S. PATHRE (1973):

Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarin

Appl. Microbiol. 26, 719-724

MIROCHA, C.J., S.V. PATHRE, B. SCHAUERHAMER und C.M. CHRISTENSEN (1976):

Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff

Appl. Environ. Microbiol. 32, 553-556

MIROCHA, C.J., B. SCHAUERHAMER, C.M. CHRISTENSEN und T. KOMMEDAHL (1979):

Zearalenone, deoxynivalenol and T-2 toxin associated with stalk rot in corn

Appl. Environ. Microbiol. 38, 557-558

MOREAU, C. 1979:

in: Moulds, Toxins and Food.

John Wiley and Sons.

Chichester, New York Brisbane, Toronto

MÜLLER, Th. und P. LEPOM (1985):

Nachweis von T-2-Toxin und Diacetoxyscirpenol in Grobfutterstoffen mit Salinenkrebslarven (*Artemia salina* L.)

Mh. Vet.- Med. 40, 486-489

NIESCHLAG, E., H.K. KLEY und K.H. USADEL (1974):

Production of steroid antisera in rabbits

aus: Steroid Immunoassay Proceedings of the 5th Tenovus Workshop Cardiff, April 1974.

Ed.by CAMERON, E.D.H., S.G. HILLIER UND K.GRIFFITHS.

NOWOTNY, P., W. BALTES, W. KRÖNERT, R. WEBER (1982):

Dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung von 22 Mykotoxinen in verschimmelten Lebensmitteln

Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 8, 24-28

OHTA, M., K. ISHII und Y. UENO (1977):

Metabolism of trichothecene mycotoxins.

I. Microsomal deacetylation of T-2 toxin in animal tissues

J. Biochem. 82, 1591-1598

OHTA, M., H. MATSUMOTO, K. ISHII und Y. UENO (1978):

Metabolism of trichothecene mycotoxins

II. Substrate specificity of microsomal deacetylation of trichothecenes.

J. Biochem. 84, 697-706

OHTSUBO, K. und M. SAITO (1977).

Chronic effects of trichothecene toxins

in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN

Mycotoxins in human and animal health, p.255-262

Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

OLDHAM, J.W., L.E. ALLRED, G.E. MILO, O. KINDIG und C.C. CAPEN (1980):

The toxicological evaluation of the mycotoxins T-2 und T-2 tetraol using normal human fibroblasts in vitro
Toxic Appl. Pharmac. 52, 159-168

PATHRE, S.V. und C.J. MIROCHA (1977):
Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence
in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN
Mycotoxins in human and animal health, p.229-253
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

DIESELBEN (1979):
Trichothecenes: natural occurrence and potential hazard
J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 820-823

PESTKA, J.J., S.C. LEE, H.P. LAU und F.S. CHU (1981):
Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin
J. Am. Oil Chem. Soc. 64, 940-944

PETERS, H., M.P. DIETRICH und K. DOSE (1982):
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 363, 1437-1441

RABIE, C.J., E.W. SYDENHAM, P.G. THIEL, A. LÜBBEN und W.F.O. MARARAS (1986):
T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley
Appl. Environ. Microbiol. 52, 594-596

ROBISON, T.S., C.J. MIROCHA, H.J. KURTZ, J.C. BEHRENS, M.S. CHI, G.A. WEAVER und S.D. NYSTROM (1979):
Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk.
J. Dairy Sci. 62, 637-641

- ROSENSTEIN, Y. und C. LAFARGE-FRAYSSINET (1983):
Inhibitory effect of Fusarium T2-toxin on lymphoid DNA and
protein synthesis
Toxic. Appl. Pharmac. 70, 283-288
- ROSENSTEIN, Y., C. LAFARGE-FRAYSSINET, G. LESPINATS, F.
LOISILLIER, P. LAFONT und C. FRAYSSINET (1979):
Immunosuppressive activity of Fusarium toxins. Effects on
antibody synthesis and skin grafts of crude extracts, T₂-toxin
and diacetoxyscirpenol
Immunol. 36, 111-117
- SATO, N. und Y. UENO (1977):
Comparative toxicities of trichothecenes
in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN
Mycotoxins in human and animal health, p.295-307
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- SZATHMARY, C.I., C.J. MIROCHA, M. PLYUSIK und S.V. PATHRE
(1976):
Identification of mycotoxins produced by species of Fusarium
and Stachybotrys obtained from Eastern Europe
Appl. Environ. Microbiol. 32, 579-584
- TAMM, C. (1977):
Chemistry and biosynthesis of trichothecenes
in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN
Mycotoxins in human and animal health, p.209-228
Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- THOMPSON, W.L. und R.W. WANNEMACHER JR. (1984):
Detection and quantitation of T2-mycotoxin with a simplified
protein synthesis inhibition assay
Appl. Environ. Microbiol. 48, 1176-1180

UENO, Y. (1977):

Trichothecenes

in: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN

Mycotoxins in human and animal health, p. 189-207

Pathotox Publishers, Inc., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

UENO, Y. (1983):

Chemistry of trichothecenes

in: Trichothecenes- Chemical, biological and toxicological aspects, II.1. p.7-19

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

UENO, Y., M. HOSOYA, Y. MORITA, I. UENO und T. TATSUNO (1968):

Inhibition of the protein synthesis in rabbit reticulocyte by nivalenol, a toxic principle isolated from *Fusarium nivale*-growing rice

J. Biochem. 64, 479-485

UENO, Y., K. ISHII, K. SAKAI, S. KANAEDA, H. TSUNODA,

T. TANAKA und M. ENOMOTO (1972a):

Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*

Japan J. Exp. Med. 42, (3) 187-203

UENO, Y., N. SATO, K. ISHII, K. SAKAI und M. ENOMOTO (1972b):

Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*

Japan J. Exp. Med. 42, (5) 461-472

UENO, Y., N. SATO, K. ISHII, K. SAKAI, H. TSUNODA und

M. ENOMOTO (1973):

Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species

Appl. Microbiol. 25, 699-704

UENO, Y., M. SAWANO und K. ISHII (1975):

Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture

Appl. Microbiol. 30, 4-9

VAN WEEMEN, B.K. und A.H.W.M. SCHUURS (1971):

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates

FEBS Lett. 15, 232-236

DIESELBEN (1975):

The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays

Immunochemistry. 12, 667-670

VISCONTI, A. und C.J. MIROCHA (1985):

Identification of various T-2 toxin metabolites in chicken excreta and tissues

Appl. Environ. Microbiol. 49, 1246-1250

WALLACE, E.M., S.V. PATHRE, C.J. MIROCHA, T.S. ROBISON und S.W. FENTON (1977):

Synthesis of radiolabeled T-2 toxin

J. Agric. Food Chem. 25, 836-838

WEI, R.D., und F.S. CHU (1985):

Modification of in vitro metabolism of T-2 toxin by esterase inhibitors

Appl. Environ. Microbiol. 50, 115-119

WEI, R.D., E.B. SMALLEY und F.M. STRONG (1972):

Improved skin test for detection of T-2 toxin

Appl. Microbiol. 23, 1029-1030

WOOD, W.G. (1984):

Luminescence immunoassays: Problems and possibilities

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, (12) 905-918

WORONIN, M. (1891):

Botanisch. Z. 49, 81

WYATT, R.D., W.M. COLWELL, P.B. HAMILTON und H.R. BURMEISTER (1973):

Neural disturbances in chickens caused by dietary T-2 toxin
Appl. Microbiol. 26, 757-761

YOSHIZAWA, T., C.J. MIROCHA, J.C. BEHRENS und S.P. SWANSON (1981):

Methabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow.
Fd. Cosmet. Toxicol. 19, 31-39

YOSHIZAWA, T., T. SAKAMOTO, Y. AYANO und C.J. MIROCHA (1982):
3'-hydroxy T-2 and 3'-hydroxy HT-2 toxins: New metabolites of
T2-toxin, a trichothecene mycotoxin, in animals
Agric. Biol. Chem. 46, (10) 2613-2615

YOSHIZAWA, T., S.P. SWANSON und C.J. MIROCHA (1980):
T-2 metabolites in the excreta of broiler chickens administered
³H-labeled T2-toxin
Appl. Environ. Microbiol. 39, 1172-1177

YOSHIZAWA, T., T. SAKAMOTO und K. OKAMOTO (1984):
In vitro formation of 3'-hydroxy T2 and 3'-hydroxy HT-2 toxins
from T2-toxin by liver homogenates from mice and monkeys
Appl. Environ. microbiol. 47, 130-134

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Herrn E. Märtlbauer und Herrn V. Renz für die vielen Anregungen und die freundliche Hilfe, und Frau U. Fink, die bei der Durchführung der praktischen Arbeiten half, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

Meiner lieben Frau danke ich für die Geduld und Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name: Selcuk Esgin

Geburtsdatum: 05.09.1948

Geburtsort: Karabük/Türkei

Eltern: Osman Esgin, Ingenieur
Hasibe Esgin, geb. Tuncabayin

Familienstand: seit 1975 verheiratet mit Ferhunde Esgin,
geb. Asar, eine Tochter

Schulbildung
und Studium: 1954-1959 Volksschule in Karabük
1959-1965 Vefa-Gymnasium in Istanbul
1965-1970 Studium der Tiermedizin an der
Universität Ankara

Approbation: Ankara, Juni 1971

Berufliche
Tätigkeit: 1.7.1971- 30.9.1972 staatlicher Tierarzt
in Karaköse

1.10.1972- 28.2.1974 Ausbildung zum
Reserveoffizier mit anschl. Wehrdienst

1.1.1975- 30.6.1978 als Assistent in der
Tierarztpraxis Dr. Weichslsdorfer/Allershausen

seit 1.11.1982 wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der
Milch der Universität München

